

Untersuchungen zur Beeinflussung der Internalisierung von Chlamydia pneumoniae in HEp-2-Zellen durch die Wachstumsfaktoren EGF und Insulin

Etablierung eines Meßsystems zur quantitativen Erfassung der Internalisierung von Chlamydia pneumoniae in HEp-2-Zellen und Ermittlung der Wirkung von EGF und Insulin auf die Internalisierung

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Christine Burkhardt geb. Raisch
geboren am 06. Februar 1976 in Filderstadt-Plattenhardt

Gutachter:

1.
2.
3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einführung in das Thema und Grundlagen	8
1. 1. Chlamydia pneumoniae	8
1. 1. 1. Bedeutung von Chlamydia pneumoniae als Krankheitserreger	8
1. 1. 2. Mikrobiologische Einordnung und Merkmale von C. pneumoniae	9
1. 1. 3. Serologische Diagnostik einer Infektion mit C. pneumoniae	9
1. 1. 4. Vermehrungszyklus der Chlamydien	9
1. 1. 5. Kultur von C. pneumoniae	10
1. 2. Epidermaler Wachstumsfaktor	11
1. 2. 1. EGF	11
1. 2. 2. Wirkung des EGF auf die Zelle	11
1. 2. 3. Der EGF-Rezeptor	12
1. 2. 4. Signalkaskade am EGF-Rezeptor	13
1. 3. Insulin	14
1. 3. 1. Insulin	14
1. 3. 2. Wirkung des Insulin auf die Zelle	15
1. 3. 3. Insulin Rezeptor	15
1. 3. 4. Signalkaskade am Insulinrezeptor	16
1. 4. Adhärenz der Chlamydien an Wirtszellen	16
1. 4. 1. Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien in Wirtszellen	16
1. 4. 2. Faktoren der Chlamydien	17
1. 4. 3. Faktoren der Wirtszelle	17
1. 5. Internalisierung von Chlamydien in Wirtszellen	18
2. Problemstellung	19
2. 1. Erlangung von genaueren Informationen über die Internalisierung von C. pneumoniae in epitheliale Zellen	19
2. 2. Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren wie EGF und Insulin auf die Internalisierung von C. pneumoniae	19
2. 3. Etablierung eines Meßsystems zur quantitativen Erfassung der Internalisierung von Chlamydia pneumoniae in HEp-2-Zellen	20
3. Material und Methoden	21
3. 1. Zellkulturen	21
3. 1. 1. BGM-Zellen:	21
3. 1. 2. HEp-Zellen	21
3. 1. 3. Vorbereiten der Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen	21
3. 1. 4. Bebrütung	23
3. 2. Chlamydien	23
3. 2. 1. Charakteristika der Organismen in Aliquots	23
3. 2. 2. Beimpfung der Zellen in den Versuchsbehältnissen	23
3. 2. 3. Infektionsraten	24
3. 3. Internalisierung der Chlamydien und Auswertung	25
3. 3. 1 Zentrifugation der beimpften Zellen	25
3. 3. 2 Inkubation der beimpften Zellen	25
3. 3. 3 Fixieren der Zellen und Anfärben der Einschlusskörperchen	25
3. 3. 4. Mikroskopie	26
3. 3. 5. Ermittlung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf einer Mikrotiterplatte bzw. pro Deckgläschen eines Röhrchens	26
3. 4. Vorversuche zur Erarbeitung der Versuchsanordnung in den Hauptversuchen	27

3. 4. 1. Versuche zur Auswahl eines geeigneten Titors für die verwendete Suspension von <i>C. pneumoniae</i>	27
3. 4. 1. 1. Versuch zur Zentrifugation mit BGM-Zellen	27
3. 4. 1. 2. Versuche zur Zentrifugation mit HEp-Zellen	28
3. 4. 2. Versuch zur Auswirkung der Verwendung von serumfreiem Medium in der Zellkultur auf die Bildung von Einschlusskörperchen	28
3. 4. 3. Versuch mit Polyethylenglykol und Actidion	28
3. 5. Hauptversuche	30
3. 5. 1. Vorbereiten der Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen	30
3. 5. 2. Vorinkubation der Zellen mit EGF und Insulin	30
3. 5. 2. 1. EGF	30
3. 5. 2. 2. Insulin.....	30
3. 5. 2. 3. Vorinkubation in der Mikrotiterplatte:	31
3. 5. 2. 4. Vorinkubation in den Zellkulturröhrchen:	31
3. 5. 3. Zahl der Chlamydien, mit der beimpft wird.....	32
3. 5. 3. 1. Versuche in Mikrotiterplatten mit Zentrifugation	32
3. 5. 3. 2. Versuche in Mikrotiterplatten ohne Zentrifugation	32
3. 5. 3. 3. Versuch in Zellkulturröhrchen mit Zentrifugation.....	32
3. 5. 4. Beimpfen der Zellen.....	32
3. 5. 5. Zentrifugation.....	32
3. 5. 6. Chlamydienkultur	32
3. 5. 6. 1. Versuche mit Zentrifugation	32
3. 5. 6. 2. Versuche ohne Zentrifugation	32
3. 5. 7. Auswertung und Statistik	33
4. Ergebnisse	34
4. 1. Vorversuche zur Erarbeitung der Versuchsanordnung	34
4. 1. 1. Versuche zur Zentrifugation.....	34
4. 1. 1. 1. Versuch zur Zentrifugation mit BGM-Zellen	34
4. 1. 1. 2. Versuch zur Zentrifugation mit HEp-2-Zellen.....	36
4. 1. 2. Versuch zur Auswirkung der Verwendung von serumfreiem Medium in der Zellkultur auf die Bildung von Einschlusskörperchen	38
4. 1. 3. Versuch mit Polyethylenglykol und Actidion.....	39
4. 2. Steigerung der Aufnahme von <i>Chlamydia pneumoniae</i> in HEp-2-Zellen durch EGF	41
4. 2. 1. Versuche mit Zentrifugieren der Mikrotiterplatten vor der Bebrütung.....	41
4. 2. 2. Ohne Zentrifugation der Mikrotiterplatten nach der Beimpfung	44
4. 2. 3. Mit Zentrifugation der Röhrchen vor der Bebrütung	48
4. 3. Steigerung der Aufnahme von <i>Chlamydia pneumoniae</i> in HEp-2-Zellen durch Insulin	50
4. 3. 1. Mit Zentrifugation der Mikrotiterplatten vor der Bebrütung	50
4. 3. 2. Ohne Zentrifugation der Mikrotiterplatten vor der Zentrifugation	53
4. 3. 3. Mit Zentrifugation der Röhrchen vor der Bebrütung	56
5. Diskussion	58
5. 1. Planung der Hauptversuche aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen	58
5. 1. 1. Auswahl der Zelllinie	58
5. 1. 2. Beeinflussung der Internalisierung durch Auswahl der geeigneten Zentrifugationsdauer und Beschleunigung.....	59
5. 1. 3. Auswahl des Mediums zur Zellkultur und Beimpfung bzw. Inkubation der Chlamydien	61
5. 1. 4. Einfluss von PEG	62
5. 1. 5. Einfluss von Actidion.....	63
5. 2. Versuchsaufbau und Fehlermöglichkeiten	63

5. 3. Beeinflussung der Internalisierung der Chlamydien durch EGF und Insulin	66
6. Zusammenfassung	71
Literaturverzeichnis	73
Danksagung	83
Lebenslauf	84
Ehrenwörtliche Erklärung	85

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintrisphosphat
BGM-Zellen	Buffalo Green Monkey Kidney-Zellen
C.	Chlamydia
C-Kette	Connecting Peptid des Insulinmoleküls
Cdc42	GTP-bindendes Protein
DAG	Diacylglycerol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DG	Deckglas
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EK	Einschlusskörperchen
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintrisphosphat
GTPase	GTP spaltendes Enzym (GTP = GDP + Phosphat)
G-PIC	Guinea Pig Inclusion Conjunktivitis
HEp-2-Zellen	Humane Zellen eines epidermoiden Karzinomes des Larynx
IFU	Inclusion forming Unit (Einschlusskörperchenbildende Einheit)
IP-3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisaccharid
MEK	MAP/ERK kinase (Serin/Threoninkinase)
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MOMP	Major Outer Membrane Protein
N	Napf einer Mikrotiterplatte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP-2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP-4	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PKB	Proteinkinase B
PLA-2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
Ras	Guaninnukleotid bindendes Protein geringer Molmasse, GTPase
Raf	Serin/Threoninkinase
Rac	GTPase
Rho	GTPase
RNS	Ribonukleinsäure
S	Steigerungsfaktor der Internalisierung durch EGF/Insulin gegenüber der Kontrolle
SH2-Domäne	SRC homology 2-Domäne
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einführung in das Thema und Grundlagen

1. 1. *Chlamydia pneumoniae*

1. 1. 1. Bedeutung von *Chlamydia pneumoniae* als Krankheitserreger

Chlamydia (C.) pneumoniae ist bekannt als weitverbreiteter Erreger von Erkrankungen der Atemwege. Allerdings kann die klinische Manifestation einer Infektion mit *C. pneumoniae* sehr unterschiedlich sein. Verläufe ohne oder nur mit milden Symptomen eines respiratorischen Infektes sind häufig.

Etwa 10% der ambulant erworbenen Pneumonien, meist mit einem atypischen Bild, werden einer Infektion mit *C. pneumoniae* zugeschrieben. Damit wird dieser Erreger in den meisten Studien unter den dritt- oder vierthäufigsten als Ursache einer Pneumonie genannt. Außerdem ist *C. pneumoniae* oft bei subakuten Bronchitiden, Sinusitiden und Pharyngitiden zu finden. (Grayston et al., 1992).

In einer großen Studie zur Bedeutung von *C. pneumoniae* als Erreger respiratorischer Erkrankungen mit 667 Studenten der Universität von Washington, die sich zwischen 1983 und 1987 mit den Symptomen einer akuten Erkrankung der Atemwege vorstellten, wurde bei 20% der Patienten serologisch eine akute Infektion mit *C. pneumoniae* nachgewiesen. In 9% war diese Infektion mit einer klinisch diagnostizierten Pneumonie assoziiert, in 20% mit einer radiologisch bestätigten. 80% dieser Patienten hatten Halsschmerzen, 30% litten an Heiserkeit (Thom et al., 1990).

In den letzten Jahren sind zunehmend Erkenntnisse über die Bedeutung der Infektion mit *C. pneumoniae* im Zusammenhang mit der Entstehung von schweren chronischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (Hahn et al., 2000) und Koronararteriosklerose (Saikku, P. et al., 1988) gewonnen worden.

Die Seroprävalenz von *C. pneumoniae*-spezifischen Antikörpern steigt mit dem Lebensalter. In Untersuchungen in der Bevölkerung von Seattle war nur ein sehr kleiner Prozentsatz der unter Fünfjährigen seropositiv. Ein steiler Anstieg zeigte sich im Alter bis 14 Jahre, bis zum 20 Lebensjahr waren bei ca. der Hälfte der Bevölkerung Antikörper nachweisbar. Ein weiterer, moderater Anstieg dieses Prozentsatzes erfolgte im Alter. Eine hohe Rate an Reinfektionen ist wahrscheinlich, da die Antikörper jeweils nur 3 bis 5 Jahre nach der Infektion nachweisbar waren (Grayston et al., 1992).

1. 1. 2. Mikrobiologische Einordnung und Merkmale von *C. pneumoniae*

Chlamydien sind durch ihren Vermehrungszyklus obligat intrazelluläre Organismen. Daher wurden sie früher als große Viren angesehen. Heute werden sie aufgrund ihres Gehaltes an DNS und RNS und der Zusammensetzung ihrer Zellmembran den gramnegativen Bakterien zugeordnet. Die Zellwand von Chlamydien ist ähnlich wie die gramnegativer Bakterien aus einer inneren und einer äußeren Membran aufgebaut. Im Gegensatz zu diesen fehlt den Chlamydien eine Peptidoglykanschicht. Die Membranstruktur wird durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den cystinreichen Proteinen der äußeren Zellmembran und anderen Zellwandkomponenten wie Lipopolysacchariden aufrechterhalten. Das erste Isolat von *C. pneumoniae* (TW-183) wurde 1965 aus dem Konjunktivalabstrich eines Kindes in Taiwan angezüchtet und als atypischer *C. psittaci*-Stamm betrachtet. (Kuo et al., 1986). 1983 wurde in Seattle, USA zum ersten mal ein Stamm von *C. pneumoniae* (AR-39) aus dem Rachenabstrich eines Studenten mit Pharyngitis angezüchtet (Grayston et al., 1986). Der Name TWAR leitet sich von „Taiwan“ und „Acute respiratory“, den ersten Isolaten ab. 1989 wurde dieser Stamm offiziell „*Chlamydia pneumoniae*“ genannt und als dritte Spezies der Gattung Chlamydia anerkannt (Grayston et al., 1989).

1. 1. 3. Serologische Diagnostik einer Infektion mit *C. pneumoniae*

Alle Chlamydien haben gemeinsame Antigene, unter anderem das hitzestabile Lipopolisaccarid (LPS). Der Komplementfixationstest kann Antikörper gegen das LPS der Chlamydien nachweisen, aber keine Unterscheidung zwischen einzelnen Spezies erbringen. *C. pneumoniae* besitzt wie die anderen Chlamydien auch ein Major Outer Membrane Protein (MOMP) von 39,5 kDa, welches aber im Gegensatz zu dem von *C. psittaci* und *C. trachomatis* nur schwach immunogen ist. Die spezifischen und am stärksten immunogenen Membranproteine von *C. pneumoniae* sind Omp4 und Omp5 mit der Masse von 97-99 kDa (Knudsen et al., 1999, Perez Melgosa et al., 1993, Campbell et al., 1990). Auch in vitro können intrazelluläre Einschlusskörperchen von *C. pneumoniae* mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen LPS nachgewiesen werden.

1. 1. 4. Vermehrungszyklus der Chlamydien

Da sich Chlamydien nur intrazellulär vermehren können, muss das infektiöse Elementarkörperchen, welches ca. 300 nm groß ist und keine messbare Stoffwechselaktivität besitzt, in eine geeignete Wirtszelle eindringen. Nach Anlagerung (Adhäsion) an die Zellmembran erfolgt die Aufnahme in die Zelle. Die chlamydienhaltigen Vesikel (Einschlusskörperchen) werden bei *C. pneumoniae* im Gegensatz zu *C. trachomatis* multipel

ausgebildet und verhindern eine Fusion mit den Lysosomen der Wirtszelle. Unter Zuhilfenahme wirtseigener energiereicher Verbindungen wandeln sich die Elementarkörperchen zu den stoffwechselaktiven Retikularkörperchen um. Diese vermehren sich in Einschlusskörperchen durch Teilung und werden nach zwei bis drei Tagen als Elementarkörperchen wieder durch Exozytose oder Lyse der Zelle freigesetzt.

Das Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* Stamm TW-183 unterscheidet sich morphologisch von denen anderer Chlamydien. Typischerweise ist es birnenförmig und besitzt um das runde Zytoplasma herum einen großen periplasmatischen Raum. Im Gegensatz dazu sind Elementarkörperchen anderer Chlamydien fast rund und haben keinen periplasmatischen Raum. Das Retikularkörperchen ähnelt denen anderer Spezies (Chi et al., 1987).

1. 1. 5. Kultur von *C. pneumoniae*

Die Isolation von *C. pneumoniae* aus Patientenproben hat sich im Vergleich zu der anderer Chlamydien als schwierig herausgestellt. Auch in der Zellkultur gelingt die Vermehrung nicht so gut wie die von *C. trachomatis*. Ein Vitalitätsverlust der Organismen ist häufig, und wenn sich Einschlusskörperchen ausbilden, sind diese oft nur klein. Deshalb wurde nach den optimalen Bedingungen sowohl für die Isolation von *C. pneumoniae* aus Abstrichmaterial als auch für ihre Vermehrung in der Zellkultur gesucht.

Üblicherweise wurden für die Kultur von *C. pneumoniae* HeLa Zellen verwendet. Es konnte aber gezeigt werden, dass sich in HEP-2-Zellen mehr Einschlusskörperchen gebildet werden als in anderen Zelllinien. (Roblin et al., 1992, Yoshizara et al., 1992).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Isolation und Kultur von Chlamydien unter dem Einfluss von Polyethylenglykol (PEG) im Medium besser gelingt. Bei der Inokulation von klinischen Isolaten von *C. pneumoniae* unter Zusatz von 7% PEG im Medium wurden in synovialen Zellen zwei bis siebenmal mehr Einschlüsse ausgebildet als im PEG-freien Medium, in HL Zellen ca. 1,3mal mehr (Berlau et al., 1996). Höhere Konzentrationen von PEG wurden als zelltoxisch beschrieben (Gibson et al., 1993).

In HEP-2 Zellen, die mit PEG-haltigem Medium vorinkubiert wurden, konnte für *C. pneumoniae* ebenfalls eine Steigerung der Zahl der Einschlusskörperchen beobachtet werden (Tjhie et al., 1997). Dieser Effekt resultiert möglicherweise daraus, dass die Hydrophobie der Zellmembran durch das PEG vermindert wird, die Fusion von Zellmembranen und so die Aufnahme der Chlamydien in die Zellen erleichtert wird.

Auch durch die Zentrifugation der mit Chlamydien beimpften Zellen wird die Aufnahme der Elementarkörperchen in die Zellen verbessert, was sich in einer höheren Anzahl gebildeter

Einschlusskörperchen zeigt. Dabei ist die Zentrifugationsbeschleunigung von entscheidender Bedeutung. Die Internalisierung von *C. pneumoniae* Stamm TWAR in HeLa 229-Zellen lässt sich durch eine Erhöhung der Zentrifugationsbeschleunigung von 900g auf 1700g um das 2,2 bis 3,6-fache steigern (Kuo and Grayston, 1988).

Ein letzter bedeutender Faktor für das Ausmaß der Internalisierung stellt die Art des zur Zellkultur verwendeten Mediums dar. Üblicherweise wird bei der Zellkultur dem Medium 10% Fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Es konnte aber gezeigt werden, dass HL-Zellen in der Kultur mit serumfreiem Medium eine 10 bis 50 mal bessere Empfänglichkeit für *C. pneumoniae* TW-183 haben (Maass et al., 1993).

1. 2. Epidermaler Wachstumsfaktor

1. 2. 1. EGF

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Polypeptid aus der Gruppe der Wachstumshormone. Er stimuliert die Proliferation epidermaler und epithelialer Zellen in lebenden Organismen und in Zellkultursystemen (Carpenter und Cohen, 1979).

EGF ist ein Polipeptid aus 53 Aminosäuren, hat eine molekulare Masse von 6045 kDa und beinhaltet interne Disulfidbrücken (Savage et al., 1972). Er ist hitze- und säurestabil.

EGF kommt in nahezu allen Körperflüssigkeiten vor und hat weder einen spezifischen Produktionsort noch einen bestimmten Wirkungsort. Fast alle Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems besitzen EGF-Rezeptoren. Im Gegensatz zu anderen Hormonen steht nicht die systemische, sondern die parakrine Wirkung des EGF im Vordergrund. Der EGF-Spiegel im menschlichen Urin liegt bei 30 - 88 ng/ml (Starkey und Orth, 1977; Gregory et al., 1977), in der Milch bei 80ng/ml (Starkey und Orth, 1977), im Speichel bei 5,6-16,8 ng/ml (Starkey und Orth, 1977) und im Plasma bei 0,2-0,8 ng/ml (Hayashi und Sakamoto, 1988).

Niedrige EGF-Spiegel im Speichel wurden bei Erkrankungen im Bereich der Mundhöhle wie der Stomatitis aphthosa, Peritonsillarabszessen und bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet (Ino et al., 1993). Bisher konnten abweichende EGF-Spiegel aber nicht eindeutig mit einer Krankheit in Zusammenhang gebracht werden.

1. 2. 2. Wirkung des EGF auf die Zelle

In vitro lassen sich verschiedene Effekte des EGF auf die Zelle zeigen. Über die Signalkaskade des EGF-Rezeptors folgen intrazelluläre Veränderungen wie die Genexpression, Veränderungen des Zellmetabolismus und eine Aktivierung intrazellulärer Proteine des Zytoskelettes (Belzen et al., 1990).

Während der ersten 10 Minuten bis zu 2 Stunden nach Zugabe von EGF steigt die Kalium-, (Rozengurt et al., 1975), Zucker- (Barnes et al., 1976) und Aminosäureaufnahme (Hollenberg et al., 1975) durch die Zelle. Außerdem zeigt sich eine Steigerung der Glykolyse und Aktivierung der Phosphofruktokinase (Schneider et al., 1978) und Membranveränderungen wie die Steigerung der Makropinozytose und die Fältelung der Membran (Brunk et al., 1976). Eine vermehrte Protein- (Hollenberg et al., 1975) und RNA-Synthese zeigt sich in 12 Stunden (Covelli et al., 1972), und der Eintritt der Zelle in die Synthesephase des Zellzyklus mit maximaler Steigerung der DNS-Synthese (Hollenberg et al., 1975) in 20 Stunden nach EGF-Zugabe.

1. 2. 3. Der EGF-Rezeptor

Nach Bindung von EGF an seinen Rezeptor wird das extrazelluläre Signal über eine Signaltransduktionskette in ein intrazelluläres verwandelt und bewirkt so die spezifischen Veränderungen in der Zelle.

1979 wurde erstmals gezeigt, dass durch die Bindung von radioaktiv markiertem EGF an Zellmembranen die Phosphorylierung verschiedener Membranproteine erfolgt. Dabei gelang auch die chromatographische Isolierung des Rezeptors (Cohen et al., 1979). Der reife Rezeptor ist ein Glykoprotein mit einer Masse von ca. 170 000 kDa, wovon ca. 40 000 kDa Kohlenhydrate sind. Der Proteinanteil hat eine Masse von 131 600 kDa und besteht aus einer Kette von 1186 Aminosäuren (Ullrich et al., 1984). Der Rezeptor besitzt zwei Domänen, die durch eine hydrophobe transmembranäre Sequenz verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 621 Aminosäuren und ist der Ort der Ligandenbindung. Charakteristisch ist der hohe Gehalt an Cysteinresten (ca. 10%) und eine hohe Anzahl von Aminosäuresequenzen, an denen eine N-glykosylierung möglich ist. Dort sind Oligosaccharide gebunden, darunter komplexkettige Zuckerreste (Oligosaccharide vom „Komplexen Typ“) und Ketten mit hohem Mannosegehalt (Oligosaccharide vom „High Mannose Typ“). Diese Oligosaccharide sind aus zwei- und mehrfach verzweigten Strukturen aufgebaut, die in den äußeren Bereichen durch eine geringe Menge an Sialinsäure und eine hohe Anzahl an Fucoseresten und terminalen N-Acetyl-Galactosaminresten charakterisiert sind (Cummings et al., 1985, Carpenter, 1987).

Die zytoplasmatische Domäne des EGF-Rezeptor besteht aus 542 Aminosäuren und beinhaltet das Carboxylende des Rezeptorproteins. Hier sitzt eine Tyrosinkinase, die nach Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne aktiviert wird.

1. 2. 4. Signalkaskade am EGF-Rezeptor

Zunächst führt die Bindung des Liganden zur Dimerisierung und Oligomerisierung der Rezeptoren. Die Rezeptortyrosinkinasen werden aktiviert, was zur intermolekularen Phosphorylierung von vier Tyrosinresten im katalytischen Zentrum an den Carboxylgruppen der Rezeptoren führt. (Honegger et al., 1989, Downward et al., 1984, Ushiro und Cohen, 1980, Carpenter et al., 1978). Die phosphorylierten Tyrosinreste bilden Bindungsstellen für zytoplasmatische Zielproteine wie die Phospholipase C gamma 1 (PLC gamma 1), GTPase Aktivierende Proteine (GAP) und andere Moleküle, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Margolis et al., 1990, Meisenhelder et al., 1989).

Diese Proteine besitzen src homology 2 (SH2)-Domänen, welche die Interaktion der tyrosinphosphorylierten Regionen des EGF-Rezeptors mit den enzymatisch wirksamen Teilen dieser Proteine vermitteln (Koch et al., 1991). Damit erfolgt eine effiziente Phosphorylierung durch die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors und in der Folge ist eine Aktivierung dieser Proteine möglich.

Die Aktivierung der PLC-gamma 1 durch ihre Phosphorylierung führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP-2) und daraus resultierend zu einem Anstieg der Spaltprodukte Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP-3) in der Zelle (Nishibe et al., 1990, Meisenhelder et al., 1989, Wahl und Carpenter, 1988).

DAG bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die Serin-und Threoninreste in vielen Zielproteinen phosphoryliert (Sawyer und Cohen, 1981).

Durch IP-3 erfolgt die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern in das Zytosol (Moolenaar et al., 1984).

Infolge der Rezeptorbindung von Wachstumsfaktoren und dem damit verbundenen Anstieg freier Kalziumionen in der Zelle wird auch die Phospholipase A2 (PLA-2) aktiviert (Spaargaren et al., 1992). Sie kann die Arachnidonsäurefreisetzung und die Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen durch die Enzyme Lipoxygenase und Cyclooxygenase vermitteln. In Abhängigkeit von der Konzentration der gebildeten Leukotriene erfolgt eine Polymerisation bzw. Depolymerisation von Aktin (Peppelenbosch et al., 1993, Brom et al., 1992). Produkte der Cyclooxygenase vermitteln außerdem die Auflösung von „Stress fibers“. „Stress fibers“ sind Bündel aus Aktinfilamenten, die mit Myosin und anderen Filamenten assoziiert sind. Sie formen kontraktile Fasern, die an der Plasmamembran enden und dort Adhäsionsorte für extrazelluläre und intrazelluläre Proteine bilden (Ridley et al., 1999). Profilin liegt in den meisten eukaryontischen Zellen vor und ist das bestcharakterisierte der aktinbindenden Proteine. Es bildet Komplexe mit Aktin (Profilaktin), die eine hohe Affinität

zu PIP 2 besitzen. Interagiert Profilaktin mit PIP-2, so führt dies zur Dissoziation und Freisetzung von Aktin, welches nun nahe der inneren Membran zur Polymerisation zur Verfügung steht (Forscher, 1992).

Gelsolin, ein anderes aktinbindendes Protein, wird durch den steigenden intrazellulären Kalziumspiegel in Gegenwart von PIP-2 aktiviert und zerlegt Aktinpolymere in kleinere Bruchstücke. So wird eine Neuorganisation der Aktinfilamente ermöglicht (Forscher, 1989).

Ein weiterer wichtiger Signaltransduktionsweg führt über Proteine aus der Ras-Superfamilie. Ras-Proteine sind membranständige, aktivierte GTP-bzw. inaktivierte GDP-bindende Proteine. Die aktivierte Tyrosinkinase des EGFR bewirkt die Bildung von aktivierten GTP-Ras-Komplexen, die dann durch Hydrolyse von GTP zu GDP und Phosphat wieder inaktiviert werden. Die dazu notwendige GTPase-Aktivität wird durch die GTPase aktivierenden Proteine stimuliert, die wiederum von der Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen abhängig sind.

Ras Proteine stellen Verbindungsglieder zwischen den Rezeptortyrosinkinasen der Zellmembran und einer intrazellulären Kaskade von Proteinkinasen dar.

Das GTP bindende Protein Ras aktiviert durch Phosphorylierung die Serin/Threoninkinase Raf, welche daraufhin die MAP/ERK kinase (MEK) stimuliert. MEK aktiviert eine Mitogen Aktivierte Proteinkinase (MAPK), die dann über weitere Effektormoleküle Einfluss auf die Zellantwort hat (Boonstra, 1999). Sie kann z. B. die Transkription regulieren.

Für die GTP bindenden Proteine Rho und Rac sind Funktionen in der Regulation des Zytoskelettes genauer bekannt. Rho induziert den Zusammenschluss von kontraktile Filamenten wie „Stress fibers“ und Rac reguliert die Ausformung von Lamellopodien und „Membrane ruffles“ (Ridley et al., 1999).

Eventuell führen diese Veränderungen des Zytoskelettes auch zur Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes nach dessen Aktivierung und zum anderen zur Internalisierung von extrazellulären Bakterien (Carpenter und Cohen, 1976a; Haigler et al, 1978).

1. 3. Insulin

1. 3. 1. Insulin

Insulin wird in den Betazellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas produziert und abhängig vom Glucoseangebot im Blut ausgeschüttet. Das Insulinmolekül ist ein Proteohormon mit einer Molekülmasse von ca. 6000 Dalton und besteht aus einer langen A-Kette aus 21 Aminosäuren, welche über zwei Disulfidbrücken mit der 30 Aminosäuren

langen B-Kette verbunden ist. Eine Vorstufe des Insulins ist das Proinsulin, aus dem durch proteolytische Abspaltung der C-Kette im Golgi-Apparat der Zelle das fertige Hormon entsteht (Löffler und Petrides, 1990).

1. 3. 2. Wirkung des Insulin auf die Zelle

Die Hauptwirkung des Insulin liegt in der Beeinflussung des Glukosemetabolismus verschiedener Zellen. Aber auch für den Proteinstoffwechsel und das Zellwachstum hat Insulin Bedeutung. So beeinflusst es über die Bereitstellung von insulinabhängigen Glucose-Carrierproteinen die Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettzellen, stimuliert die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle und die Proteinbiosynthese (Guma et al., 1993). Weitere Wirkungen auf die Morphologie von Zellen in der Zellkultur wurden beschrieben. Insulin kann, ähnlich wie auch EGF, die Struktur der Zellmembran verändern und zur Ausbildung von „Membrane Ruffles“ und zur Steigerung der Pinozytose führen (Tsakiridis et al., 1999, Kadowaki et al., 1987).

1. 3. 3. Insulin Rezeptor

Der Insulinrezeptor gehört wie auch der EGF-Rezeptor zur Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren. Dennoch unterscheidet er sich unter anderem insofern von diesem, als dass er nicht nur das Wachstum und die Differenzierung von Zellen, sondern hauptsächlich ihren Metabolismus beeinflusst. Der Insulinrezeptor konnte in einer Reihe von Geweben nachgewiesen werden, unter anderem in der Leber, dem Muskel und im Fettgewebe, aber auch in der Niere, dem ZNS und auf peripheren Blutzellen. Auch von HEp-2-Zellen wird er exprimiert (Sesti et al., 1992). Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres Glykoprotein bestehend aus jeweils zwei identischen Untereinheiten, der alpha-Untereinheit mit 723 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 135000 kDa und der beta-Untereinheit mit der Molekülmasse 95000 kDa und 620 Aminosäuren. Die alpha-Untereinheit enthält die Orte der Ligandenbindung und eine cysteinreiche Region wie auch andere Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie. Die beta-Untereinheit besteht aus drei Domänen: der extrazellulären, der transmembranären und der zytosolischen. Die zytosolische Tyrosinkinasedomäne hat eine ATP bindende Sequenz und drei Regionen von Tyrosinresten, die als Folge der Insulinwirkung phosphoryliert werden. Dazu gehört die Juxtamembranregion, die sogenannte Trityrosinregion und das carboxyterminale Ende des Rezeptors (Ullrich et al., 1985; Lee and Pilch, 1994).

In der Plasmamembran liegt der Rezeptor dann als alpha-beta-beta-alpha Molekül vor. Die einzelnen Untereinheiten sind mit Disulfidbrücken verknüpft, die beta-Untereinheit enthält

jeweils eine alfa-helikale Transmembrandomäne. Im Unterschied zum EGF-Rezeptor wird diese kovalente Bindung durch Disulfidbrücken ständig aufrechterhalten.

1. 3. 4. Signalkaskade am Insulinrezeptor

Nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor werden durch die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors Tyrosinreste der beta-Untereinheit phosphoryliert. Diese Autophosphorylierung ermöglicht die Bindung spezifischer Proteine, unter anderem der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) (Lee and Pilch, 1994).

Durch die Phosphorylierung spezifischer Tyrosylreste des IRS-1 können dort eine Reihe von Proteinen andocken, welche dann die intrazelluläre Signaltransduktion des Insulins übernehmen. Zwei Wege, die gut bekannt sind, werden durch die Bindung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) und des Proteins Grb-2 vermittelt.

Die PI-3- Kinase führt nach ihrer Aktivierung zur Spaltung von Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-phosphat (PIP-4), vorwiegend aber zur Spaltung von PIP-2.

Über diesen Signaltransduktionsweg werden weitere Proteine wie die Proteinkinase C und B aktiviert und wahrscheinlich auch das „Membrane ruffling“ ausgelöst. Der zweite Weg, der auch für andere Proteinkinaserezeptoren bekannt ist, führt über Bindung von Grb-2 zur Aktivierung von Ras. Über die Serin/Threoninkinasen Raf, die MAP/ERK kinase und die Mitogen Aktivierte Proteinkinase kommt es zur Regulation der Transkription in der Zelle (Taha und Klip, 1999, Lee and Pilch, 1994, Lange-Carter, 1993, Nishida und Gotoh, 1993).

1. 4. Adhärenz der Chlamydien an Wirtszellen

1. 4. 1. Adhäsion und Internalisierung von Chlamydien in Wirtszellen

Die Bindung der Chlamydien an mögliche Zielzellen ist der erste notwendige Schritt der Internalisierung in die Wirtszelle und somit für die bakterielle Pathogenität von erheblicher Bedeutung. Dafür sind zwei Faktoren wichtig: Zum einen das Adhäsins auf der Oberfläche der Chlamydien und zum anderen ein membranständiger Rezeptor oder eine rezeptorartige Strukturen auf der Wirtszelle, über die eine Rezeptor-Liganden-Bindung entstehen kann.

Grundsätzlich kann nicht angenommen werden, dass alle verschiedenen Spezies und Biovare der Chlamydien den selben Mechanismus der Aufnahme in Wirtszellen haben. Aber trotz aller Unterschiede gibt es zwei gemeinsame Merkmale der Chlamydieninternalisierung. Zum einen werden Chlamydien aktiv auch in solche Zellen aufgenommen, die keine „professionellen“ Makrophagen sind und zum anderen resultiert die Aufnahme in der Ausbildung einer Vakuole, in der die Chlamydien enthalten sind. Von Interesse ist nun, wie die Interaktion der Chlamydie mit der Wirtszelle zustande kommt und wie die

Internalisierung angeregt wird. Welche Oberflächenstrukturen des Elementarkörperchens und der Wirtszelle sind beteiligt?

1. 4. 2. Faktoren der Chlamydien

Es gibt verschiedene Vorstellungen davon, welche Strukturen auf der Chlamydienoberfläche als Liganden einer Bindung an die Wirtszelle in Frage kommen können.

Als ein mögliches Adhäsion wird das in großer Anzahl auf der Chlamydienoberfläche vorhandene MOMP diskutiert. Das MOMP-Molekül besitzt vier symmetrisch angeordnete Variable Domänen I – IV. Diese variieren zwischen den verschiedenen Serotypen und dienen ihrer Unterscheidung. Durch eine Zugabe von Antikörpern gegen MOMP wird eine Anlagerung des Elementarkörperchens an Zellen verhindert. Auch in vivo stellen sie den Angriffspunkt für Antikörper dar. Vermutlich vermittelt das MOMP unspezifische Funktionen wie eine elektrostatische und hydrophobe Interaktion mit der Wirtszelle (Su et al., 1990).

Es wurden verschiedene glykosylierte Proteine auf der Oberfläche von Elementarkörperchen entdeckt, die deren Bindung an die Wirtszelle vermitteln können. Hinweis darauf ist, dass durch Trypsinierung oder durch Blockierung der Kohlenhydrate mittels geeigneten Lektinen (nicht immunogene Proteine, die an spezifische Kohlenhydratstrukturen binden) die Bindungsfähigkeit vermindert oder aufgehoben wird (Swanson und Kuo, 1989).

Außerdem werden Heparansulfate als mögliche Vermittler einer Bindung diskutiert. Sie gehören zur Gruppe der Glykosaminoglykane und kommen vor allem in der extrazellulären Matrix vor, wo sie wesentlich zu den Ladungsverhältnissen auf der Zelloberfläche beitragen und im Stande sind, unterschiedliche Moleküle wie Kalzium, Peptidhormone und andere extrazelluläre Proteine reversibel zu binden. Man geht davon aus, dass ein heparansulfatähnliches Molekül auf der Oberfläche des Elementarkörperchens einen Liganden von *C. pneumoniae* und einen Wirtszellliganden gleichzeitig bindet und mit dieser Vermittlerfunktion die Aufnahme der Chlamydien erleichtert (Zhang und Stephens, 1992).

1. 4. 3. Faktoren der Wirtszelle

Die Schwierigkeit bei der Identifikation eines Wirtszellrezeptors für Chlamydien liegt darin, dass Chlamydien wahrscheinlich in der Lage sind, an verschiedene Rezeptoren zu binden. Die Kohlenhydratseitenketten verschiedener Glykolipide und Glykoproteine auf der Wirtszellmembran werden als mögliche Bindungsstellen für Chlamydien angesehen.

Eine Rolle von heparansulfatähnlichen Glucosaminoglykanen auf der Wirtszelloberfläche bei der Bindung von *C. pneumoniae* wird diskutiert. Zellen, die von Natur aus diese Moleküle

nicht ausbilden oder diese verloren haben, sind für eine *C. pneumoniae* Infektion weniger empfänglich (Wuppermann et al., 2001).

Auch Lipide werden als mögliche Rezeptoren für Chlamydien angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass *C. trachomatis* und *C. pneumoniae* an aus HeLa-Zellmembranen isoliertes Phosphatidylethanolamin (PE) binden. Asialo-GM1 und asialo-GM2 wurden ebenfalls als Liganden identifiziert (Krivan et al., 1991).

1. 5. Internalisierung von Chlamydien in Wirtszellen

Viele pathogene Bakterien sind in der Lage, in Zellen, die normalerweise nicht phagozytieren, einen der Phagozytose ähnlichen Prozess zu initiieren. In diesem Zusammenhang erfolgt meist auch ein Umbau des Zytoskelettes der Wirtszelle. Auch für Chlamydien ist das Eindringen in eine Wirtszelle ein notwendiger Schritt im Vermehrungszyklus und stellt darüber hinaus eine Möglichkeit dar, sich der wirtseigenen Abwehr zu entziehen.

Die schon oben beschriebene für Elementarkörperchen von *C. pneumoniae* typische Birnenform hat eine funktionelle Bedeutung. Durch ultrastrukturelle Beobachtungen fand man heraus, dass die Elementarkörperchen mit dem spitzen Ende zuerst an die Wirtszelle andocken, dann weitere Bindungsstellen sichern, indem sie die Zellwand vorwölben und schließlich durch die Invagination der Wirtszellmembran einen endozytotischen Vesikel bilden (Kuo et al., 1988).

C. trachomatis benutzt während ihrer Aufnahme in Wirtszellen das Zytoskelett. Chlamydienhaltige Vesikel fanden sich während der ersten Zeit nach der Aufnahme in die Zelle nicht nur zusammen mit phosphorylierten Proteinen, sondern auch mit Strukturen des Zytoskelettes. Ziel der dyneinabhängigen Bewegung der Vesikel entlang des Zytoskelettes in der Zelle ist die Nähe des Zellkernes. Allerdings konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* zur Bewegung in der Zelle im Gegensatz zu *C. trachomatis* das Netzwerk aus Mikrotubuli nicht benutzt und nur zu einer geringen Phosphorylierung von Proteinen führt (Claussen et al., 1997).

2. Problemstellung

2. 1. Erlangung von genaueren Informationen über die Internalisierung von *C. pneumoniae* in epitheliale Zellen

Genaue Informationen zum Ablauf der Internalisierung von *C. pneumoniae* in ihre Wirtszellen liegen derzeit nicht vor. Rezeptoren werden als mögliche beteiligte Strukturen bei der Aufnahme verschiedener pathogener Bakterien in Zellen diskutiert. Mechanismen, die eine Internalisierung möglicherweise vermitteln können, sind die direkte Interaktion der Bakterien mit dem Rezeptor oder die Stimulation der Expression weiterer, für die Internalisierung wichtiger Strukturen auf der Zelloberfläche oder die Veränderung der Zellwandstruktur oder des Zytoskelettes über second messenger Mechanismen nach der Stimulation bestimmter Rezeptoren.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren bei der Internalisierung von *C. pneumoniae* in epitheliale Wirtszellen zu untersuchen und damit Hinweise auf die möglichen Voraussetzungen und Abläufe bei der Internalisierung zu gewinnen.

2. 2. Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren wie EGF und Insulin auf die Internalisierung von *C. pneumoniae*

Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren die Internalisierung von verschiedenen Bakterien in epitheliale Zellen steigern können. Dabei ist aber nicht genau bekannt, worauf genau diese verbesserte Aufnahme von Bakterien beruht.

Für die Internalisierung von *C. pneumoniae* wurde (unter anderem) eine rezeptorvermittelte Endozytose beschrieben. Möglich erscheint z. B. die Beteiligung des EGF-Rezeptors als Vermittler von Umbauvorgängen des Zytoskelettes und der Zellmembran, die dann zur Aufnahme der Chlamydien führen. Als weiterer Wachstumsfaktorrezeptor mit etwas anderen Funktionen soll die Rolle des Insulinrezeptors untersucht werden.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob die Internalisierung von *C. pneumoniae* durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von EGF und Insulin in das Medium vor und während der Internalisierung gesteigert werden kann und ob diese Steigerung konzentrationsabhängig ist. Daraus können dann eventuell Rückschlüsse auf die Rolle dieser Rezeptoren gezogen werden.

Aus genauerer Kenntnis der beteiligten Strukturen des Internalisierungsvorganges lassen sich in Zukunft eventuell auch Möglichkeiten zur Hemmung der Aufnahme von Chlamydien in

ihre Zielzellen entwickeln. Möglich erscheinen dabei Stoffe, die in die Rezeptorfunktion eingreifen. Eine prophylaktische und therapeutische Anwendung solcher Stoffe bei Chlamydieninfektionen kann dann Ziel weiterer Forschungen sein.

2. 3. Etablierung eines Meßsystems zur quantitativen Erfassung der Internalisierung von *C. pneumoniae* in HEp-2-Zellen

Aus den oben aufgeführten Zielen ergibt sich die Notwendigkeit, ein zuverlässiges Meßsystem für die in den Zielzellen ausgebildeten Einschlusskörperchen zur Verfügung zu haben. Die Anzüchtung und Kultur von *C. pneumoniae* stellte sich in der Vergangenheit schwieriger dar als die anderer Chlamydien. Es gibt keine umfassenden Untersuchungen darüber, wie sich die Kultivierung dieser Organismen optimal gestalten lässt.

Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Internalisierung von *C. pneumoniae* unter verschiedenen Bedingungen wird in dieser Arbeit erstellt und verwendet.

Es soll eine Zellreihe verwendet werden, die humanen Ursprunges ist und zur Kultur von *C. pneumoniae* besonders geeignet ist. Daher wurde mit der Karzinomzelllinie HEp-2 gearbeitet. Es wurde besonderen Wert darauf gelegt, dass dieses Versuchsmodell eine Steigerung der Internalisierung durch äußere Einflüsse ermöglicht und dies auch nachgewiesen wird. Daher wurden Versuche zur Auswahl einer geeigneten Infektionsrate (Chlamydien pro Zelle) und zur Beeinflussung der Internalisierung über die Zentrifugationsdauer und Zentrifugationsbeschleunigung durchgeführt. Ziel soll es sein, dass Chlamydien und Zellen im Überschuss vorhanden sind und unter bestimmten Bedingungen vermehrt internalisiert werden.

Der Einfluss anderer Wachstumsfaktoren im Medium soll minimiert werden. Daher wird so weit wie möglich serumfreies Kulturmedium zur Anzucht der Zellen und ihrer Vorinkubation bzw. Zentrifugation der mit Chlamydien beimpften Zellen verwendet.

Der Einfluss des Zellkulturgefäßes und der Zentrifugation auf die Internalisierung der Chlamydien wird mit untersucht.

Der Versuchsablauf soll zeitlich und technisch gut reproduzierbar sein und Fehlermöglichkeiten so weit wie möglich minimiert werden. Eine Kontrolle wird in jedem Versuch mitgeführt, um unabhängig vom systematischen Fehler einen Bezugswert in jedem einzelnen Versuch zu erhalten.

3. Material und Methoden

3. 1. Zellkulturen

Für die Voruntersuchungen wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, in den Versuchen zur Internalisierung von *C. pneumoniae* unter Zusatz von Wachstumsfaktoren wurden HEp-2-Zellen verwendet.

3. 1. 1. BGM-Zellen:

Für einen Vorversuch, welcher den Einfluss der Zentrifugation auf die Ausbildung von Einschlusskörperchen zeigt, werden BGM-Zellen verwendet. Das sind Buffalo Green Monkey Kidney Zellen. (Zelllinienpass des BFA f. Viruserkrankungen der Tiere).

3. 1. 2. HEp-Zellen

HEp-2-Zellen sind permanente humane Zellen eines epidermoiden Karzinom des Larynx (ATCC CCL 23). Sie werden antibiotikafrei gezüchtet, Bakterien, Pilze und Mycoplasmen wurden in der Zellkultur wiederholt nicht nachgewiesen. Zu den Wachstumscharakteristika gehört das sehr klare, polygonale und regelmäßige Zellbild. Das Wachstum beginnt in kleinen, flächigen Kolonien. Ein konfluenter einschichtiger Zellrasen bildet sich nach 48-56 h aus (Zelllinienpass des BFA f. Viruserkrankungen der Tiere).

Diese Zellen sind sehr widerstandsfähig und überstehen Veränderungen der Temperatur, der Umweltbedingungen und des Substratangebotes ohne Vitalitätsverluste (Catalogue of cell lines and hybridomas, ATCC, 1988).

3. 1. 3. Vorbereiten der Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen

Die Zellen werden in flachen Zellkulturflaschen mit Opti-MEM 1 mit Glutamax + 10% FKS (Firma Gibco/BRL GmbH, Germany) vermehrt. Um die Zellen für die Versuche in den entsprechenden Gefäßen anzulegen, wird über der geschlossenen Zellschicht in der Kulturflasche das Medium abgesaugt und der Rasen mit 10 ml Phosphatpuffer (Phosphatbufferd solution =PBS) mehrmals gespült.

Zusammensetzung von PBS:

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,2g
H ₂ O bidest.	1l

Nach Lösung erfolgt die Autoklavierung des PBS.

Der pH-Wert des Puffers liegt bei 7,0 +/- 0,2.

Durch dreiminütiges Einwirken von 3 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung und Beklopfen der Kulturflasche wird der Zellrasen vom Flaschenboden abgelöst. Die Trypsinlösung wird durch die 1:40 Verdünnung einer Stammlösung mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

PBS	100 ml
Glukose	5g
Trypsin	10g

Die Zellen werden in 10 ml Opti-MEM 1 mit Glutamax + 10% FKS aufgeschwemmt. Durch mehrmaliges Ansaugen mit der Pipette werden Zellen, die noch untereinander adhären, vereinzelt und gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt. Dabei dürfen die Zellen nicht beschädigt werden. Um konstante Versuchsbedingungen zu erreichen, werden die Zellen in einer Kammer gezählt und auf die zur Einsaat in die Mikrotiterplatte bzw. die Röhrchen gewünschte Konzentration von $2,0 \times 10^5$ Zellen pro ml verdünnt.

Mikrotiterplatten:

Für die Versuche in sterilen 96-well-Mikrotiterplatten mit flachen, beschichteten Böden (Firma Greiner Labortechnik, Nürtingen) werden je 200 µl der Zellsuspension in einen Napf gegeben. Damit enthält jeder Napf $4,0 \times 10^4$ Zellen.

Zellkulturröhrchen:

Je 800 µl der Zellsuspension werden in ein steriles Zellkulturröhrchen mit eingelegtem runden Deckgläschen gegeben. Damit befinden sich $1,6 \times 10^5$ Zellen in jedem Röhrchen.

3. 1. 4. Bebrütung

Die Platten und Röhrchen werden 48 h in diesem serumhaltigen Medium bei 37° C und 5% CO₂ in einem Brutschrank der Firma Heraeus Instruments vom Typ BB6060 bebrütet. In einigen Versuchen wird dieses Serum nach 24 h durch ein serumfreies SF-3 Medium (Firma Cytogen) ausgetauscht. Nach 24 h Wachstum ist der Zellrasen gewöhnlich geschlossen. Lichtmikroskopisch wird kontrolliert, ob die Zellen in Form eines Monolayer am Boden haften, was ein Zeichen ihrer Vitalität ist. Ist das nicht der Fall, so werden diese Zellen nicht verwendet. Der geschlossene Rasen am Boden der Näpfe bleibt auch bei der weiteren Inkubation mit serumfreiem Medium erhalten. Vor der Beimpfung mit Chlamydien erfolgt nochmals die optische Kontrolle.

3. 2. Chlamydien

3. 2. 1. Charakteristika der Organismen in Aliquots

Es wird mit einem mycoplasmenfreien *C. pneumoniae* Stamm TW-183 gearbeitet, der in BGM-Zellen vermehrt wurde. Die Chlamydien werden geerntet und bei –80° C in Medium gefroren in Portionen gelagert. Der Titer dieses Aliquots beträgt $3,0 \times 10^9$ Inclusion Forming Units pro ml Suspension (IFU/ml). Dieser Titer wurde ermittelt, indem BGM-Zellen beimpft, eine Stunde mit 4000 g zentrifugiert, 72 Stunden bei 37 °C unter 5% CO₂ inkubiert und schließlich fixiert und angefärbt wurden. Anhand der Zahl der entstandenen Einschlusskörperchen wurde auf die Anzahl der in der Suspension enthaltenen vermehrungsfähigen Chlamydien geschlossen.

Für jeden Versuch wird ein Teil der Chlamydien rasch im handwarmen Wasserbad aufgetaut und mit PBS auf die gewünschte Versuchskonzentration verdünnt.

3. 2. 2. Beimpfung der Zellen in den Versuchsbehältnissen

Mikrotiterplatten:

Die Chlamydien werden aufgetaut und durch Zugabe von PBS die zur Beimpfung gewünschte Konzentration hergestellt. Mit einer programmierbaren, mikroprozessorgesteuerten 8-fach-Multipipette vom Typ Eppendorf Response/Multi-channel mit einem Einstellungsbereich von 5–100µl werden 100 µl der Chlamydien suspension in jeden Napf der Mikrotiterplatte gegeben und durch fünfmaliges Ansaugen und wieder Abgeben der Flüssigkeit mit dem Medium im Napf gleichmäßig vermischt. In den Hauptversuchen werden, um das bereits zur Vorinkubation der Zellen für eine Stunde verwendete wachstumsfaktorhaltige Medium belassen zu können, 10µl einer 10fach höher konzentrierte Chlamydien suspension zugegeben.

Letztendlich entspricht die Zahl der darin enthaltenen Chlamydien der der in 100µl der 10fach mehr verdünnten Suspension enthaltenen.

Zellkulturröhrchen:

Mit einer Eppendorf-Pipette werden in jedes Röhrchen 200 µl der geeigneten Chlamydien suspension gegeben und durch fünfmaliges Ansaugen und wieder Abgeben der Flüssigkeit mit dem Medium im Röhrchen vermischt.

3. 2. 3. Infektionsraten

Die Infektionsrate wird definiert als die Anzahl der eingesäten Chlamydien im Verhältnis zur Anzahl der eingesäten Zellen im jeweiligen Gefäß.

Die aus den Vorversuchen gewonnenen Erfahrungen bezüglich der Infektionsrate werden für die Auswahl in den Hauptversuchen verwendet. Dabei erwartet man für die Beimpfung eines Napfes einer Mikrotiterplatte mit 2×10^4 Chlamydien (d. h. 100µl einer Suspension mit $2,0 \times 10^5$ oder 10µl einer Suspension mit $2,0 \times 10^6$ Chlamydien pro Milliliter), also einer Infektionsrate von 0,5 Chlamydien pro Zelle günstige Bedingungen zum einen für die Möglichkeit der Steigerung der Internalisierung unter der Zugabe von Wachstumsfaktoren, zum anderen für die Auszählung der gebildeten Einschlusskörperchen. Dabei spielt vor allem die Anzahl der Einschlusskörperchen pro Gesichtsfeld eine Rolle, die nicht zu hoch sein sollte, um Zählfehler zu vermeiden. Außerdem sollte die Objektivvergrößerung nicht zu hoch gewählt werden, um einen möglichst großen Anteil des Napfbodens zu repräsentieren.

Herstellung der verschiedenen Verdünnungen des Ausgangsaliquots ($3,0 \times 10^9$ IFU/ml) und Berechnung der jeweiligen Infektionsrate für die Vor- und Hauptversuche zur Internalisierung von *C. pneumoniae*:

	Zellzahl im Gefäß	Verdünnung des Ausgangsaliquots	Chlamydien pro ml	Menge der zugegebenen Chlamydien suspension	Zahl der eingesäten IFU	Infektions- rate (Chlamydien pro Zelle)
Zellkultur- Röhrchen	1,6 x 10 ⁵	1:7 500 (S2)	$4,0 \times 10^5$	200µl	$8,0 \times 10^4$	0,5
		1:37 500 (S3)	$8,0 \times 10^4$	200µl	$1,6 \times 10^4$	0,1
Napf einer Mikrotiter- platte	4,0 x 10 ⁴	1:7 500 (S2)	$4,0 \times 10^5$	100µl	$4,0 \times 10^4$	1,0
		1:37 500 (S3)	$8,0 \times 10^4$	100µl	$8,0 \times 10^3$	0,2
		1:15 000	$2,0 \times 10^5$	100µl	$2,0 \times 10^4$	0,5
		1:1 500*	$2,0 \times 10^6$	10µl	$2,0 \times 10^4$	0,5
		1:20	$1,5 \times 10^8$	10µl	$1,5 \times 10^6$	38

Tab. 1: Darstellung der verschiedenen Infektionsraten und deren Berechnung.

* um einen reibungslosen Versuchsablauf zu gewähren, wurde der zehnte Teil einer zehnfach-konzentrierten Menge der Chlamydien suspension in den Hauptversuchen verwendet.

3. 3. Internalisierung der Chlamydien und Auswertung

3. 3. 1. Zentrifugation der beimpften Zellen

Die beimpften Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen werden bei 37°C zentrifugiert. Es wird eine Zentrifuge der Firma Hettich vom Typ Rotanta 96 RSC mit geschlossenen Behältern mit entsprechenden Einsätzen für Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen verwendet.

3. 3. 2 Inkubation der beimpften Zellen

Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und zur Bebrütung 200 µl serumfreies SF-3 Medium (Cytogen) in einen Napf der Mikrotiterplatte bzw. 800µl in ein Zellkulturröhrchen gegeben. Dann erfolgt im Brutschrank die Inkubation bei 37° C und 5% CO₂ für 72 h.

3. 3. 3 Fixieren der Zellen und Anfärben der Einschlusskörperchen

In Mikrotiterplatten:

Die Zellen werden fixiert und gefärbt, um die mittlerweile entstandenen, noch intakten Einschlusskörperchen auszählen zu können. Der optimale Zeitpunkt dafür ist nach 72 h Bebrütung. Das Medium in den Näpfen wird durch Stürzen der Platte auf eine dicke Lage saugfähigen Papiers unter der Sicherheitsbox entfernt. Es wird nicht mehr abgesaugt, um den Zellrasen zu schonen. Dann wird 99,8%iges Methanol zugegeben und die Zellen dadurch fixiert. Das Methanol wird abgegossen und neues in die Näpfe gefüllt, welches mindestens 5 min auf die Zellen einwirkt. Nach Entfernen des Methanols erfolgt das Waschen der Zellen mit je 100 µl 0,1%-igem Tween 20-PBS pro Napf. Das Detergens erhöht die Permeabilität der Zellmembran für die Antikörper. Anschließend wird mit 10 µl fluoreszenzmarkiertem Antikörper gegen das Oberflächenantigen Lipopolysaccharid der Einschlusskörperchen pro Napf gefärbt. Es wurde ImagenTM Chlamydia (Firma DAKO Diagnostic Co., Ltd.) verwendet. In früheren Untersuchungen zeigte sich dieser fluoreszenzmarkierte Antikörper als eine sensitive Methode zur Identifizierung von Einschlusskörperchen von Chlamydia pneumoniae in Zellkulturen (Miyashita et al., 1996). Der Antikörper wird im Verhältnis 1 : 5 mit 0,1%igem Tween 20- PBS-und Evansblue verdünnt. Das zugegebene Evansblue färbt den Zellrasen an und dient so seiner Kontrastierung. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37° C. Dann kann der Farbstoff abgegossen werden, der Zellrasen wird noch einmal mit 100 µl 0,1%igem Tween 20-PBS pro Napf gewaschen und mit 100 µl PBS-Glycerin 1 : 10 pro Napf bedeckt.

In Zellkulturröhrchen:

Das Medium wird abgesaugt und in jedes Röhrchen werden ca. 500 µl Methanol gegeben. Nach fünfminütigem Einwirken werden die sich auf dem Boden der Zellkulturröhrchen befindlichen Deckgläschen mit den Zellen entnommen, getrocknet und mit der zellbehafteten Seite nach oben auf Glasobjektträger aufgeklebt. 10 µl des oben beschriebenen Antikörpers werden mit einer feinen Drahtöse auf dem Zellrasen verteilt, ohne ihn zu beschädigen.

Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wird der Farbstoff abgespült, der Objektträger getrocknet, mit ImagenTM Mounting Fluid bedeckt und ein weiteres Deckgläschen daraufgelegt.

3. 3. 4. Mikroskopie

In Mikrotiterplatten:

Es wird ein Umkehrmikroskop vom Typ IX 70 der Firma Olympus mit Fluoreszenzeinrichtung verwendet. Die angefärbten Einschlusskörperchen sind darunter gut sichtbar. Der Zellrasen wird auf Intaktheit geprüft, da nur unter dieser Bedingung ein zuverlässiges und vergleichbares Ergebnis bei der Auswertung zu erwarten ist. Die Anzahl der Einschlusskörperchen in einem mikroskopischen Gesichtsfeld wird ermittelt, wobei die am Rand angeschnittenen Einschlusskörperchen nur zur Hälfte mitgezählt werden. In einem Napf werden 10 Gesichtsfelder ausgezählt.

In Zellkulturröhrchen:

Nach Prüfung der Intaktheit des Zellrasens werden die Einschlusskörperchen von je zehn Gesichtsfeldern eines Deckgläschens ausgezählt. Dazu wird ein Mikroskop des Typs Axioskop 20 (Firma Zeiss) mit Fluoreszenzeinrichtung verwendet. Die am Rand angeschnittenen Einschlusskörperchen werden zur Hälfte mitgezählt.

3. 3. 5. Ermittlung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf einer Mikrotiterplatte bzw. pro Deckgläschen eines Röhrchens

Der Mittelwert von zehn ausgezählten Gesichtsfeldern wird berechnet und mit einem Faktor multipliziert, der das Verhältnis der Fläche des Gesichtsfeldes und des Napfbodens bzw. Deckgläschens wiedergibt. Dieser Faktor ist abhängig von der Vergrößerung des verwendeten Objektives und der Größe der Bodenfläche des Gefäßes. Durch Multiplikation erhält man so die Zahl der entstandenen Einschlusskörperchen auf dem gesamten Napfboden.

Ermittlung der Umrechnungsfaktoren für die Berechnung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen

In einem Napf der Mikrotiterplatte:

Objektiv-vergrößerung	Radius des Gesichtsfeldes in mm	Fläche des Gesichtsfeldes A(Napf) in mm ²	Radius des Napfbodens in mm	Fläche des Napfbodens A(Ges.) in mm ²	Umrechnungsfaktor = A(Napf)/A(Ges.)
20fach	0,55	0,95	3,1	30,19	32
40fach	0,27	0,22	3,1	30,19	137
60fach	0,18	0,10	3,1	30,19	314

Tab. 2: Ermittlung des Umrechnungsfaktors für die Näpfe der Mikrotiterplatte

In einem Zellkulturröhrchen:

Objektiv-vergrößerung	Radius des Gesichtsfeldes in mm	Fläche des Gesichtsfeldes A(Ges.) in mm ²	Radius des Deckgläschen in mm	Fläche des Deckgläschen A(DG) in mm ²	Umrechnungsfaktor = A(DG)/A(Ges.)
20fach	0,74	0,76	6,5	132,8	175
40fach	0,25	0,20	6,5	132,8	677

Tab. 3: Berechnung des Umrechnungsfaktors für die Deckgläschen

3. 4. Vorversuche zur Erarbeitung der Versuchsanordnung in den Hauptversuchen

Um die optimalen Bedingungen für die Kultur der Chlamydien und Darstellung des Einflusses von Wachstumsfaktoren herauszufinden, wurden in Vorversuchen verschiedene Einflussfaktoren auf das Zellkultursystems variiert und der Effekt auf die Internalisierung der Organismen ermittelt.

3. 4. 1. Versuche zur Auswahl eines geeigneten Titters für die verwendete Suspension von *C. pneumoniae*

3. 4. 1. 1. Versuch zur Zentrifugation mit BGM-Zellen

Zellkulturröhrchen mit je $1,6 \times 10^5$ BGM-Zellen werden 48 h mit serumhaltigem Medium inkubiert. Jedes Röhrchen wird mit $8,0 \times 10^4$ IFU von *C. pneumoniae* beimpft. Dazu werden 200 µl einer 1:7 500-fachen Verdünnung des Ausgangsaliquots in jedes Zellkulturröhrchen gegeben. Die Infektionsrate beträgt 0,5. Je zwei Röhrchen werden unter den selben Bedingungen zentrifugiert:

-Zentrifugation mit der Beschleunigung 0, 1000, 2000, 4000g unter Beibehaltung der Zentrifugationszeit von 1 h.

-Zentrifugation mit der Dauer von 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min unter Beibehaltung der Zentrifugationsbeschleunigung von 4000g. Nach Inkubation und Anfärben der Einschlusskörperchen wird die Zahl der Einschlusskörperchen pro Deckglas ausgezählt.

3. 4. 1. 2. Versuche zur Zentrifugation mit HEp-Zellen

Es werden Zellkulturröhrchen mit HEp-2-Zellen 48 h in serumhaltigem Medium inkubiert und anschließend jedes Röhrchen mit $8,0 \times 10^4$ IFU beimpft. Dazu werden 200µl einer 1:7 500-fachen Verdünnung des Ausgangsaliquots in jedes Zellkulturröhrchen gegeben. Die Zentrifugation erfolgt unter den verschiedenen Bedingungen für jeweils ein Röhrchen.

-Zentrifugation mit 4000g, 60 min

-Zentrifugation mit 1000g, 20, 15, 10, 5 min

-Zentrifugation mit 750g, 20, 15, 10, 5 min

-Zentrifugation mit 500g, 20, 15, 10, 5 min

- Zentrifugation mit 250g, 5, 15 min

3. 4. 2. Versuch zur Auswirkung der Verwendung von serumfreiem Medium in der Zellkultur auf die Bildung von Einschlusskörperchen

Es werden HEp-2-Zellen in Mikrotiterplatten verwendet. In jedem Napf befinden sich $4,0 \times 10^4$ Zellen. Eine Haltung der Zellen über 48 h in serumfreiem Medium gelingt nicht. Die Zellen verlieren ihre Vitalität, was sich in Abrunden und fehlender Adhärenz am Boden des Gefäßes zeigt. Daher wird das serumhaltige Medium in der Hälfte der 40 Näpfe nach 24 h durch serumfreies ausgetauscht.

Je 10 Näpfe mit und ohne serumhaltigem Medium werden nach insgesamt 48 h mit $4,0 \times 10^4$ Chlamydien, je 10 mit $8,0 \times 10^3$ IFU beimpft. In beiden Fällen wird das Medium ausgetauscht. Die Zentrifugation erfolgt 15 Minuten lang bei 1000g. Nach Inkubation und Färbung werden die Einschlusskörperchen pro Napf ausgezählt.

3. 4. 3. Versuch mit Polyethylenglykol und Actidion

Im folgenden Versuch wurde dem Medium während der Zentrifugation verschiedene Konzentrationen PEG zugegeben und der Einfluss auf die Einschlusskörperbildung ermittelt. Einem Teil der Näpfe wird während der Zeit der Zentrifugation und Inkubation nach Zugabe der Chlamydien actidionhaltiges Medium zugegeben. Der Versuch wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, deren Näpfe je $4,0 \times 10^4$ Zellen enthalten. 24 Näpfe werden mit $4,0 \times 10^4$ IFU beimpft. Davon werden jeweils vier Näpfe mit 0%, 3%, 5%, 7,5%, 10% und 12,5% PEG im Medium während der Zentrifugation behandelt. Die Mikrotiterplatten werden mit 1000g 15 Minuten lang zentrifugiert. Je zwei gleiche Ansätze werden danach mit

actidionhaltigem Medium behandelt, die anderen beiden mit actidionfreiem. Nach Inkubation und Färbung werden die Einschlusskörperchen pro Napf ausgezählt.

3. 5. Hauptversuche

3. 5. 1. Vorbereiten der Mikrotiterplatten und Zellkulturröhrchen

Einsaat der Zellen und Inkubation für 24 h in serumhaltigem Medium und für 24 h in serumfreiem Medium.

3. 5. 2. Vorinkubation der Zellen mit EGF und Insulin

Es werden die verschiedenen Konzentrationen des EGF- und Insulinhaltigen SF-3 Medium für die Vorinkubation der Zellen hergestellt.

3. 5. 2. 1. EGF

Die Ausgangskonzentration des EGF beträgt 100 µg/ml. In einer Verdünnungsreihe werden die folgenden Konzentrationen hergestellt:

Stufe	Konzentration
1	20 µg/ml
2	10 µg/ml
3	5 µg/ml
4	2,5 µg/ml
5	1,25 µg/ml
6	0,675 µg/ml

3. 5. 2. 2. Insulin

Die Ausgangskonzentration des Insulins beträgt 1 mg/ml. In einer Verdünnungsreihe werden die folgenden Konzentrationen hergestellt.

Stufe	Konzentration
1	1000 ng/ml
2	100 ng/ml
3	10 ng/ml
4	1 ng/ml
5	0,1 ng/ml
6	0,01 ng/ml

3. 5. 2. 3. Vorinkubation in der Mikrotiterplatte:

In der Mikrotiterplatte mit den vor 48 h eingesäten Zellen wird das Medium abgesaugt und in vier Näpfe jeweils 100 µl derselben Konzentration von EGF- bzw. insulinhaltigem SF-3 Medium gegeben. Kontrollen werden in 24 Näpfen mit jeweils 100 µl SF-3 Medium durchgeführt. Die Näpfe an den Längsseiten der Mikrotiterplatten wurden freigelassen, da der Zellrasen dort häufig nicht lückenlos ist. Die Zellen werden 1 h bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Das folgende Schema der Mikrotiterplatte soll die einzelnen Versuchsansätze zeigen.

A													
B	EGF (µg/ml)	20	20	10	10	5	5	2,5	2,5	1,25	1,25	0,675	0,675
C	EGF (µg/ml)	20	20	10	10	5	5	2,5	2,5	1,25	1,25	0,675	0,675
D	Insulin (ng/ml)	1000	1000	100	100	10	10	1	1	0,1	0,1	0,01	0,01
E	Insulin (ng/ml)	1000	1000	100	100	10	10	1	1	0,1	0,1	0,01	0,01
F	Kontr- olle	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um
G	Kontr- olle	Medi- -um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um	Medi- um
H													

3. 5. 2. 4. Vorinkubation in den Zellkulturröhrchen:

Diese entspricht der Vorinkubation der Zellen in der Mikrotiterplatte, wobei in jedes Röhrchen 440 µl EGF- oder insulinhaltiges Medium gegeben wird. Dabei werden analog zur Mikrotiterplatte jeweils vier Röhrchen mit derselben Konzentration EGF- bzw. insulinhaltigen SF-3 Mediums und 12 Näpfe mit SF-3 Medium ohne Wachstumsfaktoren behandelt. Die Zellen werden 1 h bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3. 5. 3. Zahl der Chlamydien, mit der beimpft wird

3. 5. 3. 1. Versuche in Mikrotiterplatten mit Zentrifugation

In jeden Napf der Mikrotiterplatte werden 10 µl einer Chlamydien suspension gegeben, die $2,0 \times 10^6$ IFU/ml enthält. Es befinden sich also dann $2,0 \times 10^4$ IFU in jedem Napf. Bei $4,0 \times 10^4$ Zellen pro Napf beträgt die Infektionsrate 0,5 IFU/Zelle.

3. 5. 3. 2. Versuche in Mikrotiterplatten ohne Zentrifugation

Damit ohne Zentrifugation eine adäquate Infektion der Zellen erreicht wird, muss der Titer der Chlamydien suspension höher gewählt werden. Es wird mit einem Titer von $1,5 \times 10^8$ IFU/ml bzw. $1,5 \times 10^6$ IFU/Napf gearbeitet. Die Infektionsrate beträgt hier 38 IFU/Zelle.

3. 5. 3. 3. Versuch in Zellkulturröhrchen mit Zentrifugation

Es werden 44 µl der Chlamydien suspension mit dem Titer $2,0 \times 10^6$ IFU/ml in ein Zellkulturröhrchen gegeben. Das entspricht $8,8 \times 10^4$ IFU pro Röhrchen. Bei $1,6 \times 10^5$ Zellen pro Röhrchen beträgt die Infektionsrate 0,5 IFU/Zelle.

3. 5. 4. Beimpfen der Zellen

Wie oben beschrieben

3. 5. 5. Zentrifugation

15 min bei 1000g.

3. 5. 6. Chlamydienkultur

3. 5. 6. 1. Versuche mit Zentrifugation

Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und zur Bebrütung 200 µl serumfreies SF-3 Medium in einen Napf der Mikrotiterplatte bzw. 800µl in ein Zellkulturröhrchen zugegeben. Dann erfolgt die Inkubation bei 37° C und 5% CO₂ für 72 h.

3. 5. 6. 2. Versuche ohne Zentrifugation

Das egf-haltige Medium wurde nach Zugabe der Chlamydien im ersten Versuch noch 6 h auf den Zellen belassen und dann durch 200 µl SF-3 Medium ersetzt. Im zweiten Versuch wird das egf-haltige Medium noch 24 h belassen und dann durch 200 µl SF-3 Medium ersetzt. Dann erfolgt die Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ für 72 h.

3. 5. 7. Auswertung und Statistik

Es wird für jeweils die Näpfe bzw. Röhrchen, in denen die Zellen mit derselben Konzentration EGF bzw. Insulin im Medium vorbehandelt wurden, der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Um die Steigerung der Einschlusskörperchenbildung zwischen den beiden Versuchen gleicher Anordnung, aber mit differenten absoluten Werten vergleichen zu können, wurden sogenannte Steigerungsfaktoren (S) berechnet. Sie drücken das Verhältnis der Zahl der gebildeten Einschlüsse unter Einfluss von EGF zu der Zahl der gebildeten Einschlüsse in der Kontrolle. Entsprechendes gilt für die mit Insulin behandelten. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$S_{\text{Konz. EGF/Insulin}} = \frac{\text{Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen unter dem Einfluss einer bestimmten Konzentration von EGF/Insulin (Konz. EGF/Insulin)}}{\text{Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen in der Kontrolle ohne EGF/Insulin}}$$

Da nicht klar ist, ob es sich um normalverteilte Stichproben handelt, wird mit dem U-Test für zwei unabhängige Stichproben nach Mann und Whitney gearbeitet. Dabei werden die Messwerte von je vier Stichproben unter dem Einfluss einer bestimmten Konzentration des Wachstumsfaktors mit der Kontrolle verglichen.

Der Test in dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS durchgeführt. Als Ergebnis wird die zweiseitige Exakte Signifikanz gewählt.

4. Ergebnisse

4. 1. Vorversuche zur Erarbeitung der Versuchsanordnung

4. 1. 1. Versuche zur Zentrifugation

Mit Änderung der Zentrifugationszeit und Beschleunigung soll erreicht werden, dass nicht alle Chlamydien internalisiert werden, sondern nur ein kleinerer Teil. Dies ermöglicht in den Hauptversuchen dann erst das Aufzeigen einer Wirkung der Wachstumsfaktoren hin zu einer gesteigerten Internalisierung noch freier Chlamydien in freie Zellen.

4. 1. 1. 1. Versuch zur Zentrifugation mit BGM-Zellen

Zentrifugationszeit (in min)	5	10	15	20	30	60
Mittelwert (EK/DG)	$4,03 \times 10^4$	$5,55 \times 10^4$	$7,01 \times 10^4$	$7,43 \times 10^4$	$8,56 \times 10^4$	$9,78 \times 10^4$
Standardabweichung (EK/DG)	$1,08 \times 10^4$	$5,24 \times 10^3$	$1,05 \times 10^4$	$9,24 \times 10^2$	$1,08 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$
Prozent von 4000g/60min	41%	57%	72%	76%	87%	100%

Tab. 4: Mittelwert der Einschlusskörperchen pro Deckglas (EK/DG) und ihre Standardabweichung bei verschiedener Dauer der Zentrifugation mit 4000g.

EK/DG: Einschlusskörperchen pro Deckglas

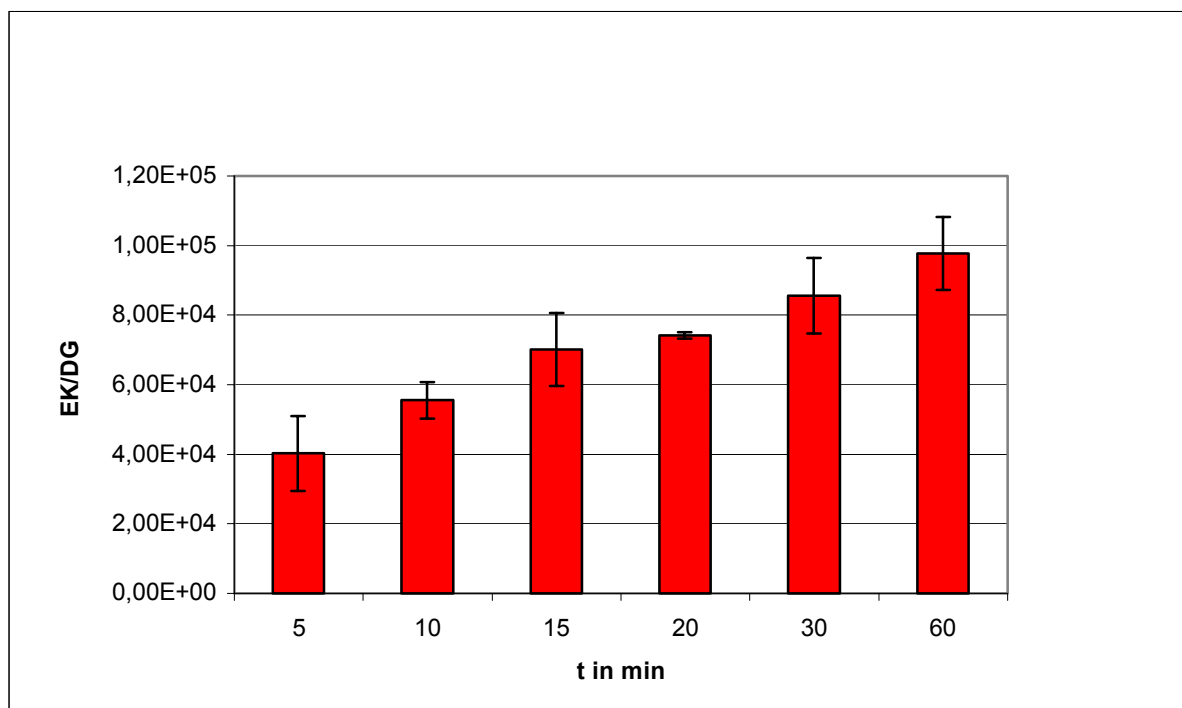


Abb. 1: Mittelwert der Einschlusskörperchen pro Deckglas in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer bei 4000g.

Die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen auf BGM-Zellen unter den Bedingungen einer einstündigen Zentrifugation mit 4000g liegt über der Zahl der eingesäten Chlamydien pro Röhrchen. Sie erscheint unmöglich, da sich theoretisch nur $8,0 \times 10^4$ Chlamydien in einem Röhrchen befinden. Da der Titer des Ausgangsaliquots aber experimentell ermittelt wurde, unterliegt er einem Fehler, der sich durch Abweichung des Maximalwertes in diesem Versuch bemerkbar macht.

Bei konstanter Zentrifugalbeschleunigung von 4000g zeigt sich ein Anstieg der Zahl der Einschlusskörperchen pro Deckglas mit zunehmender Zentrifugationsdauer. In den ersten 15 Minuten der Zentrifugation werden pro 5 Minuten ca. $1,5 \times 10^4$ EK/DG mehr gebildet. Danach ist die Steigerungsrate geringer. Insgesamt werden bei einstündiger Zentrifugation im Vergleich zur fünfminütigen Zentrifugation 2,4 mal so viele Einschlusskörperchen gebildet.

Zentrifugationsbeschleunigung g	0g	1000g	2000g	4000g
Mittelwert (EK/DG)	$2,19 \times 10^2$	$9,08 \times 10^4$	$1,01 \times 10^5$	$9,78 \times 10^4$
Standardabweichung (EK/DG)	$1,24 \times 10^1$	$1,26 \times 10^4$	$1,42 \times 10^4$	$4,62 \times 10^3$
Prozent von 4000g, 60 min	0,22%	93%	103%	100%

Tab. 5: Mittelwert der Einschlusskörperchen pro Deckglas und ihre Standardabweichung in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung bei 60-minütiger Zentrifugation.

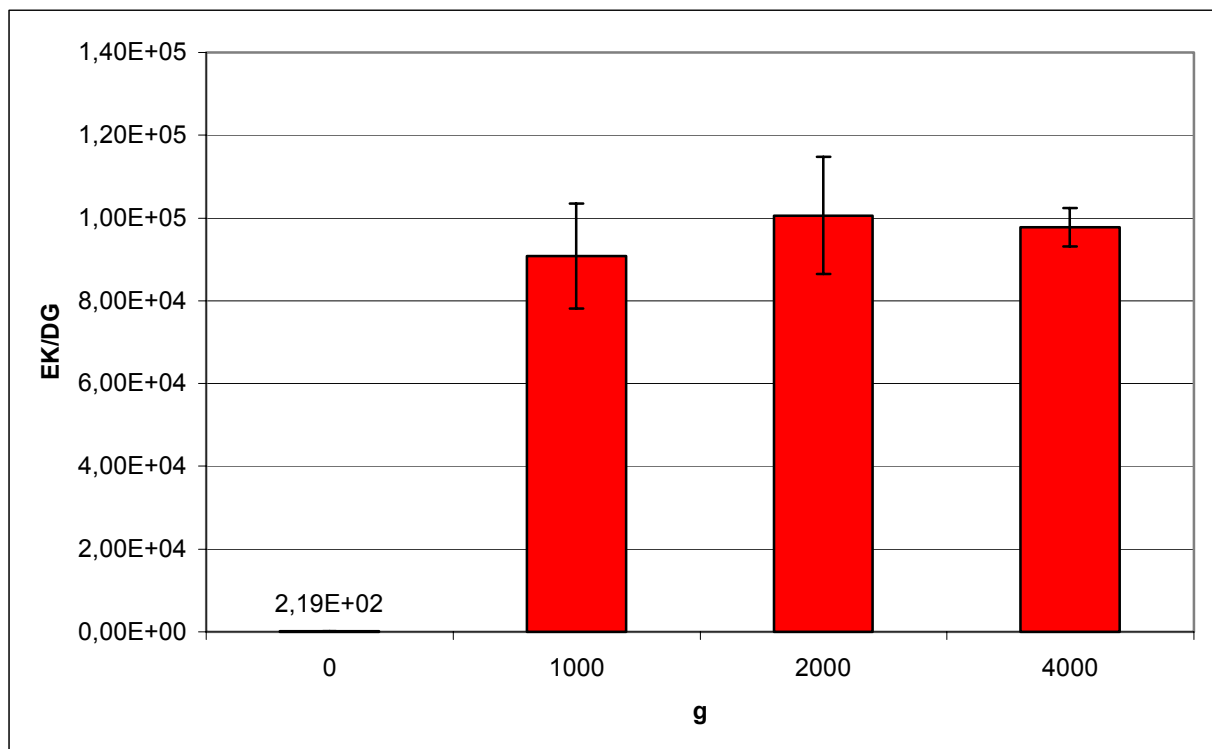


Abb. 2: Menge der Einschlusskörperchen pro Deckglas in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung bei 60-minütiger Zentrifugation.

Durch eine einstündige Zentrifugation mit 1000g werden ca. 400mal mehr Einschlusskörperchen pro Deckglas mehr gebildet als nach einer Stunde ohne Zentrifugation. Eine weitere Steigerung der Zentrifugationsbeschleunigung bringt, wenn überhaupt, nur noch eine geringe Erhöhung der Zahl gebildeter Einschlusskörperchen.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Anzahl der IFUs durch Veränderung der Zentrifugationsdauer im Bereich bis zu 15 Minuten und der Zentrifugationsbeschleunigung im Bereich bis zu 1000g am effektivsten beeinflusst werden kann. Weitere Versuche mit HEp-2-Zellen in diesen Bereichen werden durchgeführt und die Reduktion beider Einflussgrößen werden dabei kombiniert, um eine reduzierte Internalisierung der vorliegenden Chlamydien zu erreichen.

4. 1. 1. 2. Versuch zur Zentrifugation mit HEp-2-Zellen

		Zentrifugalbeschleunigung (g)			
		250	500	750	1000
Dauer der Zentrifugation (in min)	5	$<10^3$	$1,51 \times 10^3$ EK/DG	$2,61 \times 10^3$ EK/DG	$2,03 \times 10^3$ EK/DG
	10		$4,59 \times 10^3$ EK/DG	$4,74 \times 10^3$ EK/DG	$6,84 \times 10^3$ EK/DG
	15	$2,89 \times 10^3$	$7,00 \times 10^3$ EK/DG	$9,69 \times 10^3$ EK/DG	$1,20 \times 10^4$ EK/DG
	20		$6,77 \times 10^3$ EK/DG	$8,80 \times 10^3$ EK/DG	$1,19 \times 10^4$ EK/DG

Tab. 6: Anzahl der Einschlusskörperchen pro Deckglas bei verschiedener Zentrifugalbeschleunigung und Dauer der Zentrifugation.

		Zentrifugalbeschleunigung (g)			
		250	500	750	1000
Dauer der Zentrifugation (in min)	5		6%	10%	8%
	10		18%	19%	27%
	15	12%	28%	38%	48%
	20		27%	35%	48%

Tab. 7: Prozentualer Anteil der Einschlusskörperchen pro Deckglas vom Vergleichswert unter 60-minütiger Zentrifugation mit 4000g ($2,5 \times 10^4$ EK/DG).

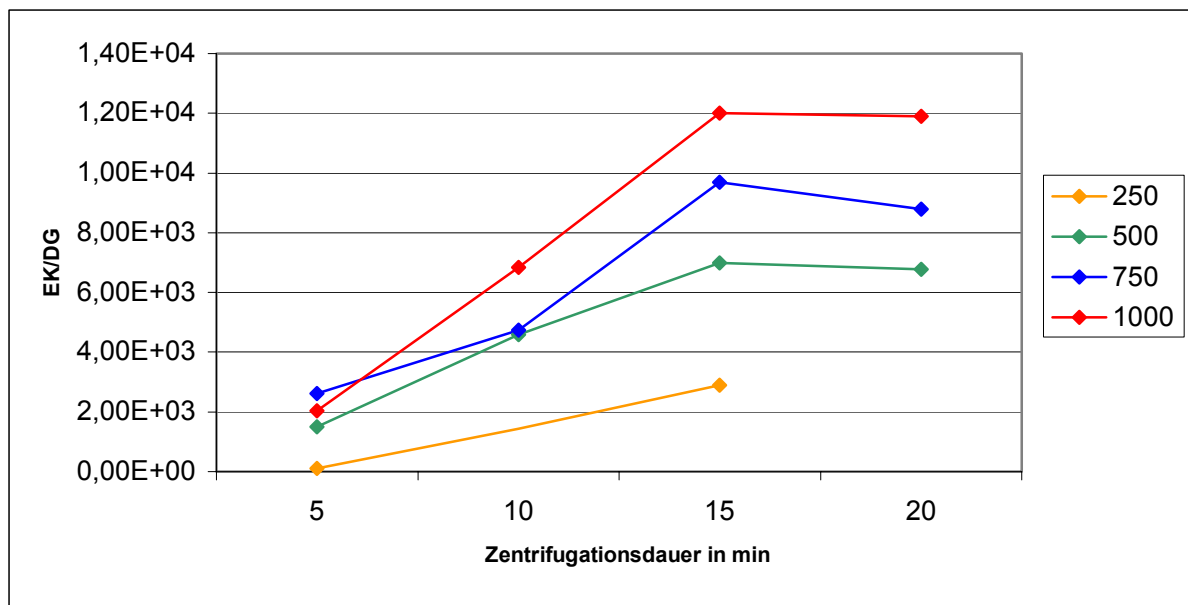


Abb. 3: Anzahl der Einschlusskörperchen pro Deckglas in Abhängigkeit von der Dauer bei verschiedener Zentrifugationsbeschleunigung.

Die Internalisierung und Ausbildung von Einschlusskörperchen in HEp-2-Zellen wird näher betrachtet, da diese Zellen für die weiteren Versuche verwendet werden sollen. Veränderungen im Bereich der Zentrifugationsdauer bis zu 15 Minuten und im Bereich der Zentrifugationsbeschleunigung zwischen 0 und 1000g beeinflussen im vorhergehenden Versuch mit BGM-Zellen die Internalisierung der Chlamydien am effektivsten. In diesem Bereich werden weitere Untersuchungen mit HEp-2-Zellen durchgeführt.

$8,0 \times 10^4$ eingesäte Chlamydien pro Röhrchen bilden auf HEp-2-Zellen nach einstündiger Zentrifugation mit 4000g $2,5 \times 10^4$ Einschlusskörperchen pro Deckglas aus. Das entspricht etwa einem Viertel derer auf BGM-Zellen. Außerdem fällt auf, dass die Einschlüsse in HEp-2-Zellen kleiner sind. 32% der IFU bilden einen Einschluss aus.

Mit einer höheren Zentrifugationsbeschleunigung steigt auch die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen. Bei einer Zentrifugationsdauer von 15 und 20 Minuten steigt die Zahl der internalisierten Einschlusskörperchen mit jeweils 250g zusätzlicher Zentrifugationsbeschleunigung um etwa den Faktor 1,4. Tendenziell zeigt sich dies auch bei der Zentrifugationsdauer von 10 Minuten.

Eine Verlängerung der Zentrifugationszeit von 10 auf 15 Minuten geht bei allen Zentrifugationsbeschleunigungen mit einem deutlichen Anstieg der Anzahl gebildeter Einschlusskörperchen einher.

Bei einer Zentrifugationsdauer von 20 Minuten im Vergleich zu 15 Minuten kommt es zu einer nur noch geringen (750g) oder keiner Steigerung der Einschlusskörperchenbildung

mehr. Bei einer 15 bzw. 20-minütigen Zentrifugation mit 1000g werden nur noch etwa halb so viele Einschlusskörperchen gebildet wie bei einer einstündigen Zentrifugation mit 4000g. Das bedeutet, dass von $8,0 \times 10^4$ IFUs unter diesen Bedingungen nur ca. 15% einen Einschluss ausbilden und dass dies allein durch die Änderung der Zentrifugationsbedingungen verdoppelt werden kann.

4. 1. 2. Versuch zur Auswirkung der Verwendung von serumfreiem Medium in der Zellkultur auf die Bildung von Einschlusskörperchen

	48h serumhaltiges Medium		In den letzten 24 h serumfreies Medium	
IFU/Napf	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
$4,0 \times 10^4$	$1,50 \times 10^3$ EK/N	$3,11 \times 10^2$ EK/N	$3,71 \times 10^3$ EK/N	$6,4 \times 10^2$ EK/N
$8,0 \times 10^3$			$8,48 \times 10^2$ EK/N	$2,10 \times 10^2$ EK/N

Tab. 8: Vergleich der Anzahl der Einschlusskörperchen pro Napf nach Haltung der Zellen 48h in serumhaltigem Medium und nach Haltung der Zellen für 24h in serumhaltigem und anschließend 24h in serumfreiem Medium.

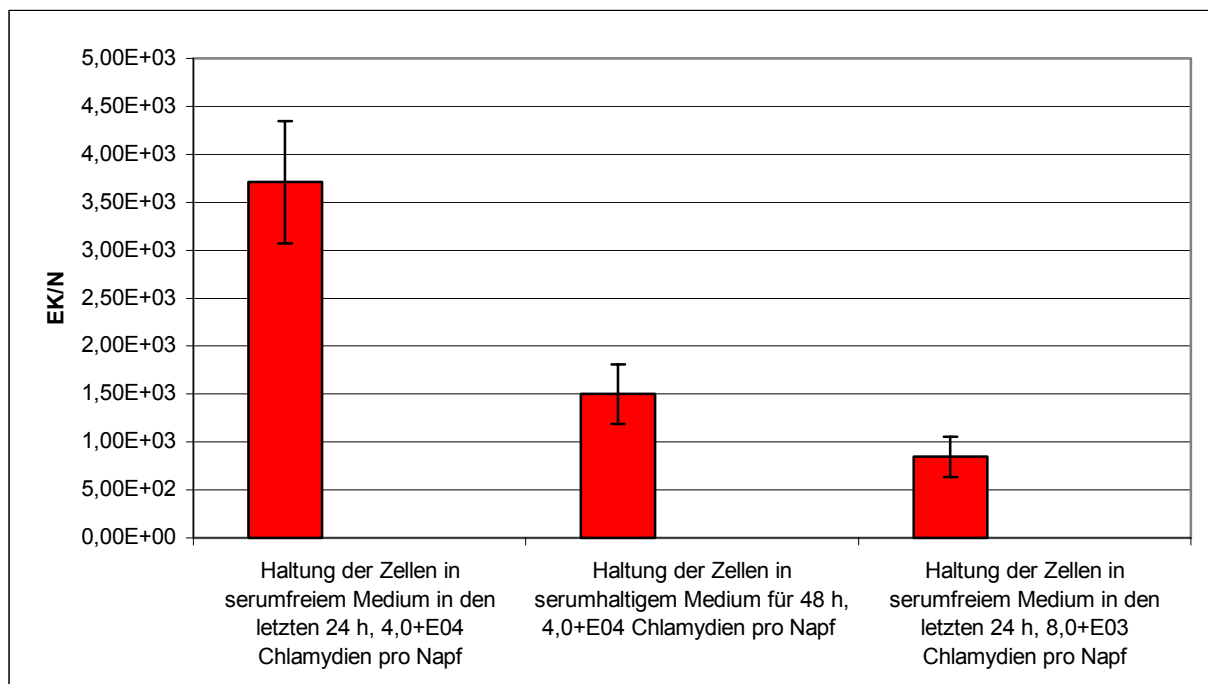


Abb. 4: Vergleich der Anzahl der Einschlusskörperchen pro Napf unter serumhaltigem und serumfreiem Medium in den letzten 24h der Zellinkubation.

Jeweils 10 Näpfe wurden mit $4,0 \times 10^4$ IFUs und jeweils 10 mit $8,0 \times 10^3$ IFUs beimpft und nach 24 h normaler Inkubation 24 h serumfrei gehalten. Die Kontrolle von je 10 Näpfen wurde 48 h mit serumhaltigem Medium inkubiert.

Die Anzahl der Einschlusskörperchen pro Napf nach Inkubation der Zellen nur in serumhaltigem Medium war bei der niedrigeren Infektionsrate zu gering, um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten.

Im Vergleich zu den Ansätzen, die nicht serumfrei gehalten wurden, ist die Zahl der Einschlusskörperchen unter serumfreier Inkubation in den letzten 24 h mehr als doppelt so hoch (Faktor 2,47).

Etwa 9 % bzw. 11% der eingesäten Chlamydien bilden unter der Bedingung der serumfreien Inkubation in Mikrotiterplatten einen Einschlusskörper aus. Im Vergleich dazu bilden mit Inkubation im serumhaltigen Medium knapp 4% einen Einschlusskörper aus. Das ist nicht einmal ein Drittel des in Zellkulturröhrchen unter diesen Bedingungen ermittelten Anteiles.

4. 1. 3. Versuch mit Polyethylenglykol und Actidion

		Konzentration des PEG					
		0%	3%	5%	7,50%	10%	12,50%
Ohne Actidion	MW	$9,19 \times 10^2$	$9,68 \times 10^3$	$1,10 \times 10^4$	$1,01 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$	$1,01 \times 10^4$
	Stabw	$2,86 \times 10^2$	$1,19 \times 10^3$	$1,70 \times 10^3$	$2,86 \times 10^3$	$2,15 \times 10^3$	$3,27 \times 10^2$
Steigerung gg. 0%PEG			5%	16%	9%	31%	9%

Tab. 9: Zahl der Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von PEG während der Zentrifugation. Prozentuale Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter Wirkung von PEG während der Zentrifugation gegenüber der Kontrolle ohne PEG.

		Konzentration des PEG					
		0%	3%	5%	7,50%	10%	12,50%
Mit Actidion	MW	$6,57 \times 10^3$	$8,22 \times 10^3$	$8,12 \times 10^3$	$8,55 \times 10^3$	$8,80 \times 10^3$	$7,54 \times 10^3$
	Stabw	$6,13 \times 10^1$	$2,04 \times 10^1$	$1,47 \times 10^3$	$1,96 \times 10^3$	$2,88 \times 10^3$	$1,63 \times 10^3$
Steigerung gg. 0%PEG			20%	19%	23%	25%	13%
Reduktion d. Actidion		29%	15%	26%	15%	34%	25%

Tab. 10: Zahl der unter verschiedenen Konzentrationen von PEG während der Zentrifugation und unter der Wirkung von Actidion während der Inkubation. Prozentuale Steigerung der Einschlusskörperchenbildung mit PEG gegenüber der Zentrifugation ohne PEG und Reduktion der Einschlusskörperchenbildung durch Actidion im Vergleich mit den Kontrollen ohne Actidion.

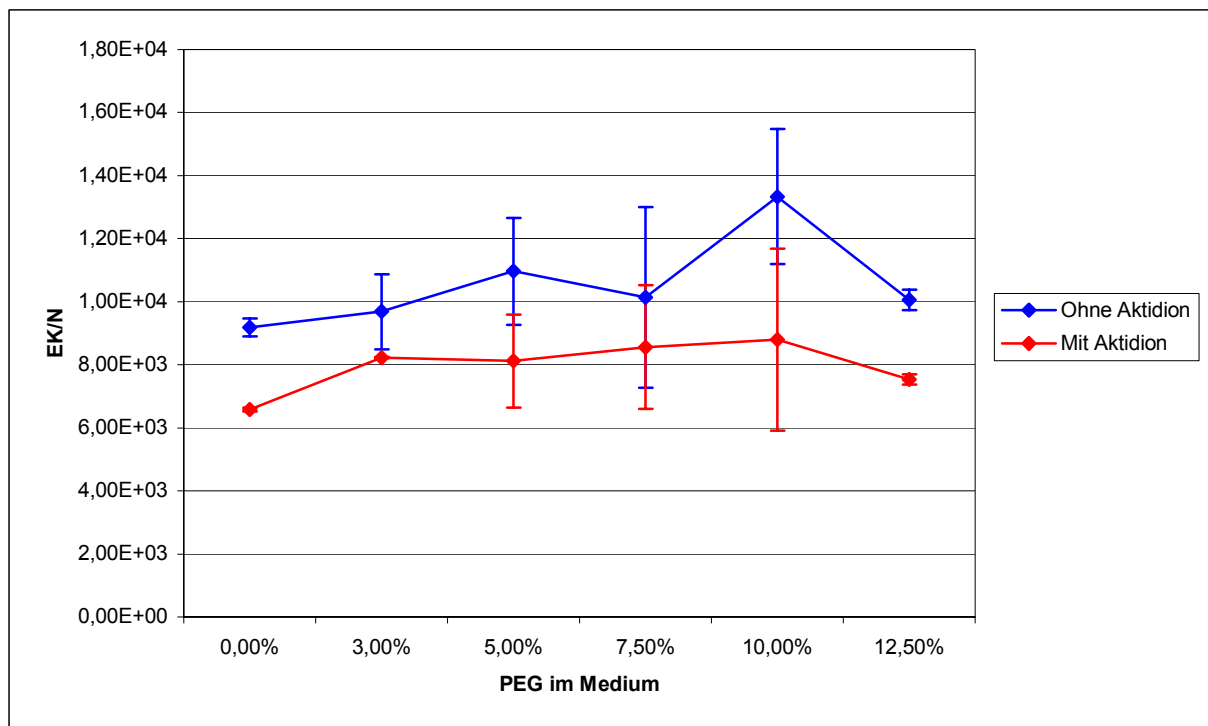


Abb. 5: Zahl der Einschlusskörperchen pro Napf in Abhängigkeit der Konzentration von PEG im Medium während der Zentrifugation mit und ohne Actidion im Medium während der Inkubation.

Dem Medium wird während der Zentrifugation PEG in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Eine Steigerung der Zahl der Einschlusskörperchen mit der PEG-konzentration ist erkennbar. In der Gruppe ohne und mit actidionhaltigem Medium zur Inkubation erreicht sie einen Gipfel bei 10% PEG im Medium während der Zentrifugation, bei einer PEG-Konzentration über 10% fällt die Zahl der Einschlusskörperchen pro Napf wieder ab. Die Steigerung durch das PEG beträgt zwischen 5% und 31% gegenüber der Kontrolle ohne PEG. Ohne PEG bilden etwa ein Fünftel aller eingesäten Chlamydien einen Einschluss, durch die Wirkung von 10% PEG bilden ein Drittel einen Einschluss. Unter der Wirkung von Actidion steigert sich der Anteil der Einschlusskörperchenbildenden Chlamydien von 16 auf 22% unter 10% PEG ($8,8 \times 10^3$ statt $6,57 \times 10^3$).

Eine Wirkung des Actidion ist in der Kontrollgruppe ohne PEG und in allen Gruppen unter PEG-Behandlung erkennbar. Actidion reduziert die Zahl der Einschlusskörperchen pro Napf um 15 bis maximal 34% in der Gruppe, die unter dem Einfluss von 10% PEG im Medium zentrifugiert wurde und hier den größten Zuwachs der Einschlusskörperchenbildung aufweist.

4. 2. Steigerung der Aufnahme von Chlamydia pneumoniae in HEp-2-Zellen durch EGF

4. 2. 1. Versuche mit Zentrifugieren der Mikrotiterplatten vor der Bebrütung

Versuch 1:

EGF-Konz.	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml	0,625 µg/ml	0 µg/ml
EK/N	1,50E+03	2,63E+03	2,87E+03	2,30E+03	2,16E+03	2,39E+03	1,53E+03
Stabw.:	6,81E+02	4,68E+02	4,75E+02	4,92E+02	5,23E+02	7,30E+02	4,47E+02
p-Wert	≤0,571	≤0,003	≤0,001	≤0,04	≤0,40	≤0,40	

Tab. 11: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen EGF-Konzentrationen

im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

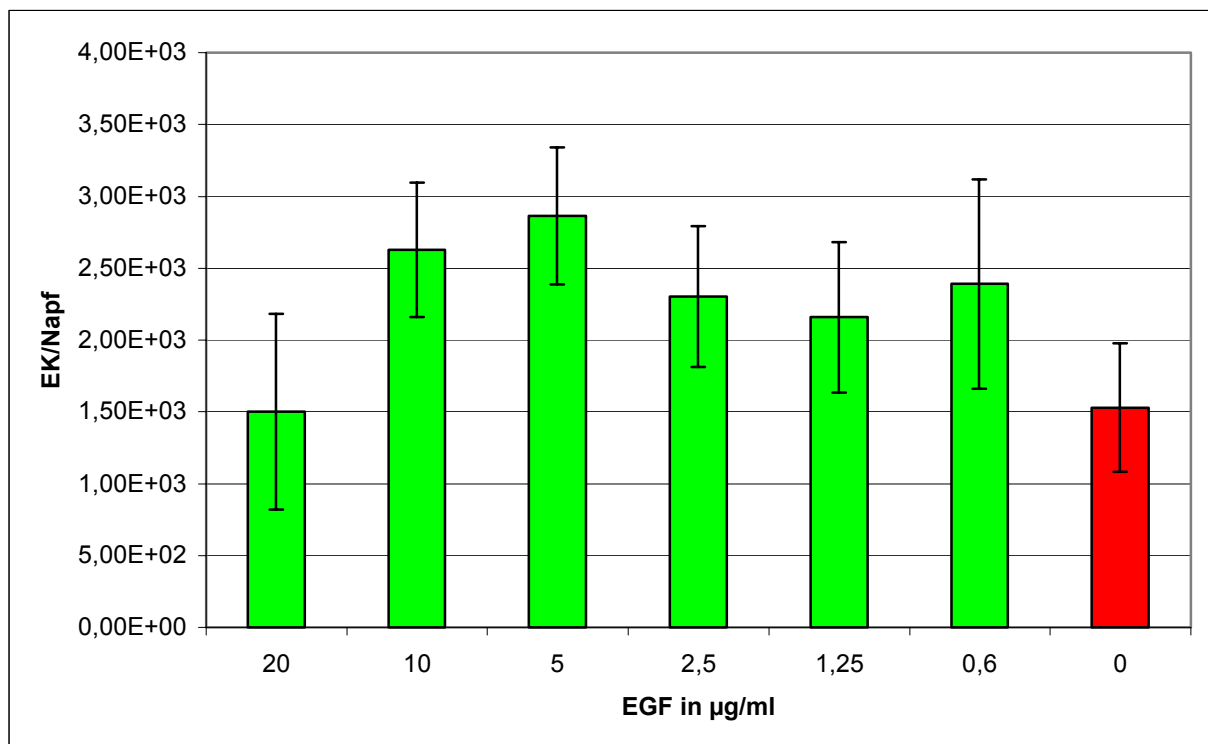


Abb. 6: Anzahl den gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von EGF im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Maximal entstehen unter dem Einfluss von 5 µg/ml EGF 1,9 mal mehr Einschlusskörperchen als in der Kontrolle mit serumfreiem Medium während der Vorinkubation. In der Kontrolle bilden etwa 7,5% der eingesäten IFU einen Einschlusskörper aus.

Es fällt auf, dass unter dem Einfluss von 20 µg/ml werden etwa gleich viele Einschlüsse gebildet wie in der Kontrolle gebildet werden.

Versuch 2:

EGF-Konz.	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml	0,625 µg/ml	0 µg/ml
EK/N	8,06E+02	1,08E+03	9,76E+02	9,68E+02	8,37E+02	7,57E+02	3,71E+02
Stabw.:	2,92E+02	6,38E+01	1,19E+02	1,38E+02	9,18E+01	1,08E+02	6,75E+01
p-Wert	≤0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Tab. 12: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen EGF-Konzentrationen im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

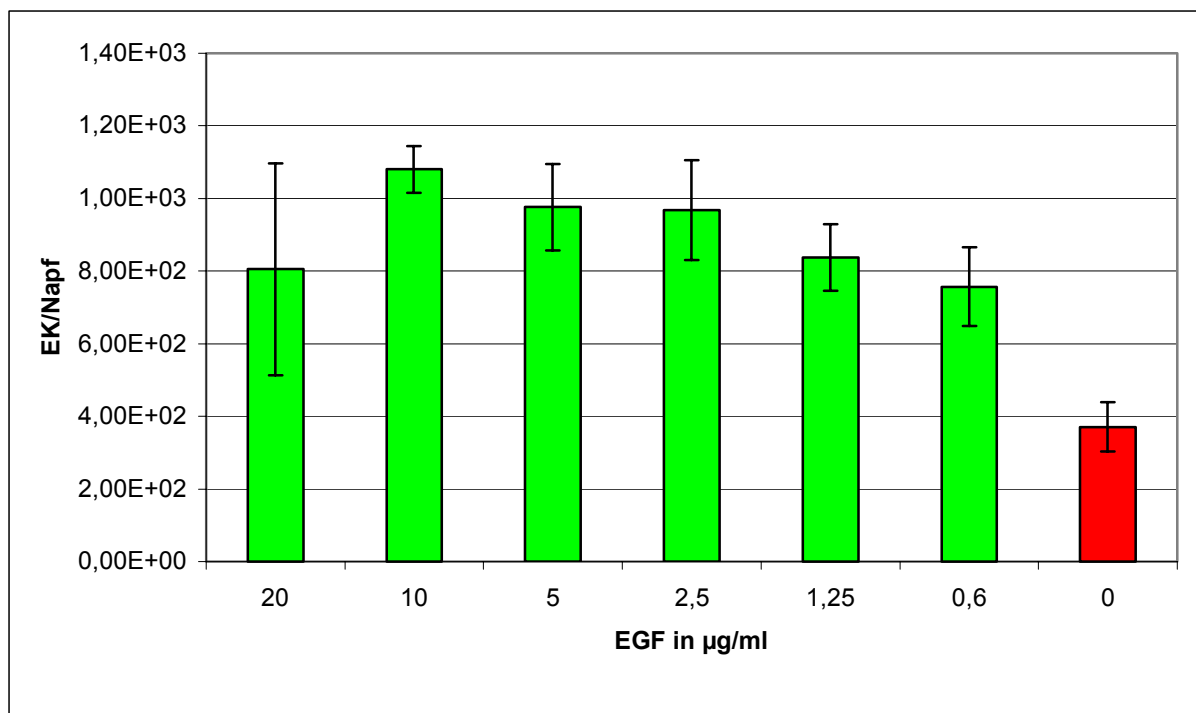


Abb. 7: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von EGF im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Es fällt auf, dass die absoluten Zahlen der gebildeten Einschlusskörperchen nur etwa ein Viertel derer aus dem Vorversuch betragen.

Unter dem Einfluss von EGF ist die Zahl der Einschlüsse durchweg höher als in der Kontrolle. Maximal werden unter 10µg/ml EGF im Medium 2,9 mal so viele Einschlüsse gebildet wie ohne Vorinkubation mit EGF. Im Unterschied zum vorherigen Versuch mit der selben Versuchsanordnung lassen sich hier auch unter der Wirkung von 20 µg/ml EGF deutlich mehr, nämlich etwa doppelt so viele Einschlusskörperchen nachweisen wie in der Kontrolle.

Steigerung der Anzahl gebildeter Einschlusskörperchen unter dem Einfluss von EGF

	20µg/ml	10µg/ml	5µg/ml	2,5µg/ml	1,25µg/ml	0,6µg/ml
S (Versuch 1)	0,98	1,72	1,88	1,50	1,41	1,56
S (Versuch 2)	2,17	2,91	2,63	2,61	2,26	2,04
MW:	1,58	2,32	2,26	2,06	1,84	1,80
Stabw.	8,41E-01	8,41E-01	5,30E-01	7,85E-01	6,01E-01	3,39E-01

Tab. 13: Durchschnittliche Steigerung der Internalisierung unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen EGF in der Vorinkubation.

S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter EGF im Vergleich zur Kontrolle

MW: Mittelwert der beiden Steigerungsfaktoren

Stabw: Standardabweichung der beiden Steigerungsfaktoren

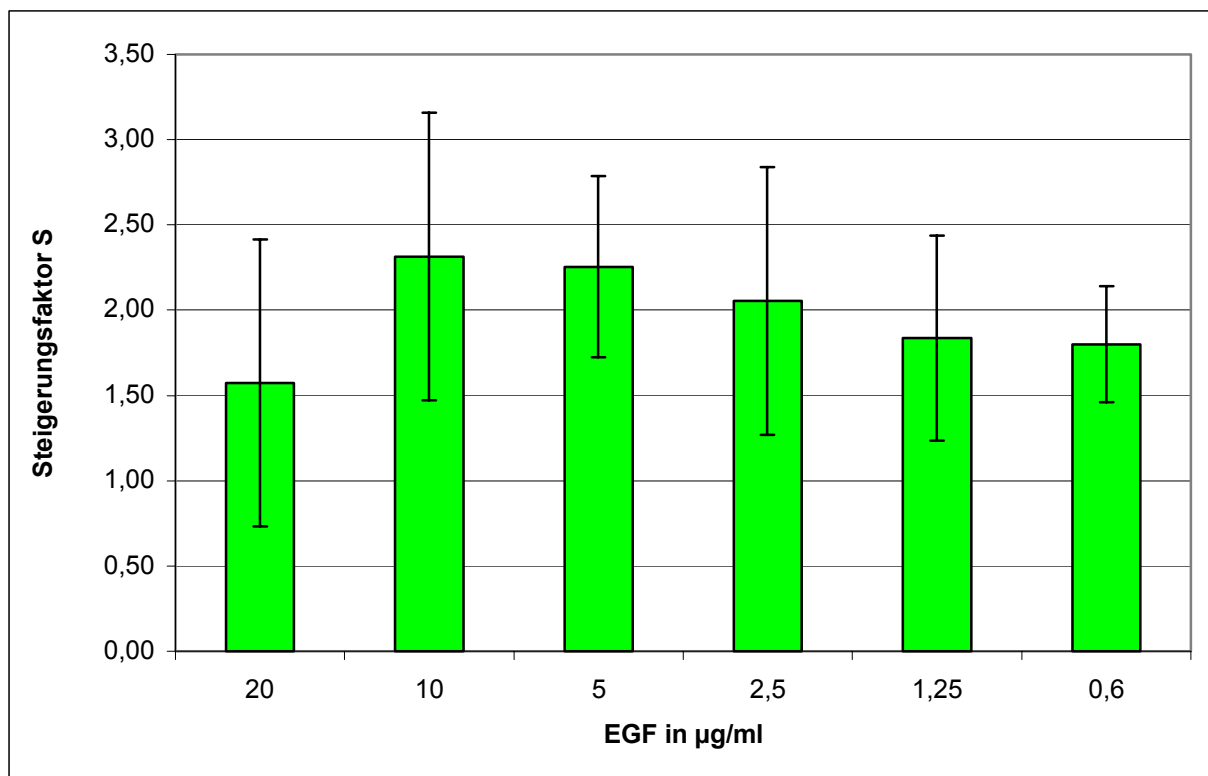


Abb. 8: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen EGF in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der beiden Steigerungsfaktoren. Der Fehlerbalken entspricht der einfachen Standardabweichung in beide Richtungen.

Bildet man die Mittelwerte aus den beiden bei gleicher EGF-Konzentration in der Vorinkubation ermittelten Steigerungsfaktoren, so zeigt sich ein Maximum bei 10µg/ml mit 2,3 fach gesteigerter Einschlusskörperchenbildung und ein Abfall mit fallender EGF-Konzentration. Unter 20g EGF werden weniger Einschlüsse gebildet als in der Kontrolle.

4. 2. 2. Ohne Zentrifugation der Mikrotiterplatten nach der Beimpfung

Um unspezifische Einflüsse der Zentrifugation auf die Internalisierung ganz auszuschließen, werden Versuche ohne Zentrifugation durchgeführt. Das EGF-haltige Medium wurde zur einstündigen Vorinkubation und 24 bzw. 6 Stunden nach der Einsaat der Chlamydien belassen.

Versuch 3:

EGF-Konz.	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml	0,625 µg/ml	0 µg/ml
EK/N.	1,42E+03	2,11E+03	2,33E+03	1,63E+03	1,44E+03	1,47E+03	1,54E+03
Stabw.:	7,75E+02	2,84E+02	3,28E+02	3,19E+02	1,86E+02	2,09E+02	2,86E+02
p-Wert	≤1,00	≤0,001	≤0,001	≤0,521	≤0,316	≤0,446	

Tab. 14: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen EGF-Konzentrationen im Medium während einstündiger Vorinkubation und weiteren 24 Stunden. Mittelwert aus jeweils vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

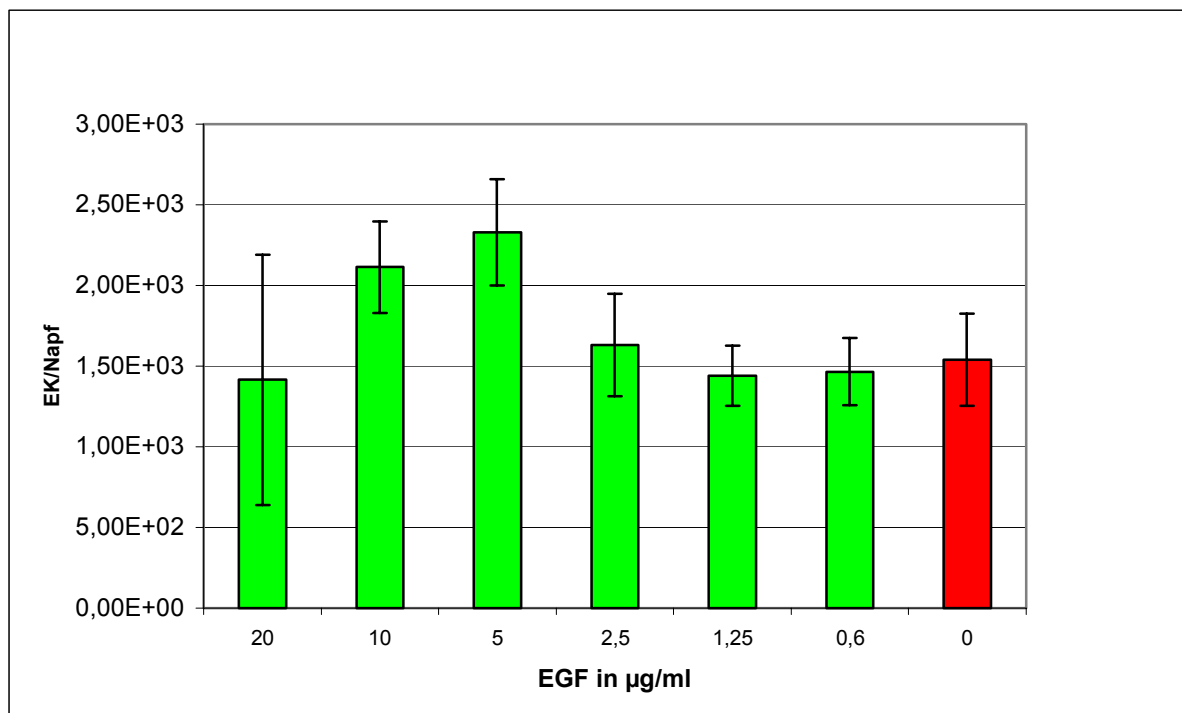


Abb. 9: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von EGF im Medium während einstündiger Vorinkubation und weiteren 24 Stunden. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Eine deutliche Steigerung der Einschlusskörperchenbildung zeigt sich nur unter dem Einfluss von 10 und 5 µg EGF/ml Medium. Maximal werden unter 5µg/ml EGF etwa 1,7 mal so viele Einschlüsse gebildet wie ohne den Einfluss von EGF. Unter den anderen Konzentrationen von EGF wird keine signifikante Steigerung der Einschlusskörperchenbildung beobachtet.

Bei einem 75fach höheren Infektionstiter im Vergleich zu den Versuchen mit Zentrifugation liegt die Anzahl der internalisierten Chlamydien deutlich niedriger, es werden nur etwa 0,1% der Chlamydien internalisiert.

Versuch 4:

EGF-Konz.	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml	0,625 µg/ml	0 µg/ml
EK/N.	5,93E+02	6,99E+02	5,62E+02	5,17E+02	4,56E+02	4,11E+02	2,95E+02
Stabw.:	6,56E+01	1,39E+02	8,52E+01	7,37E+01	9,97E+01	1,01E+02	7,55E+01
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	≤0,001	≤0,029	

Tab. 15: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen EGF-Konzentrationen im Medium während einstündiger Vorinkubation und weiteren 6 Stunden. Mittelwert aus jeweils vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

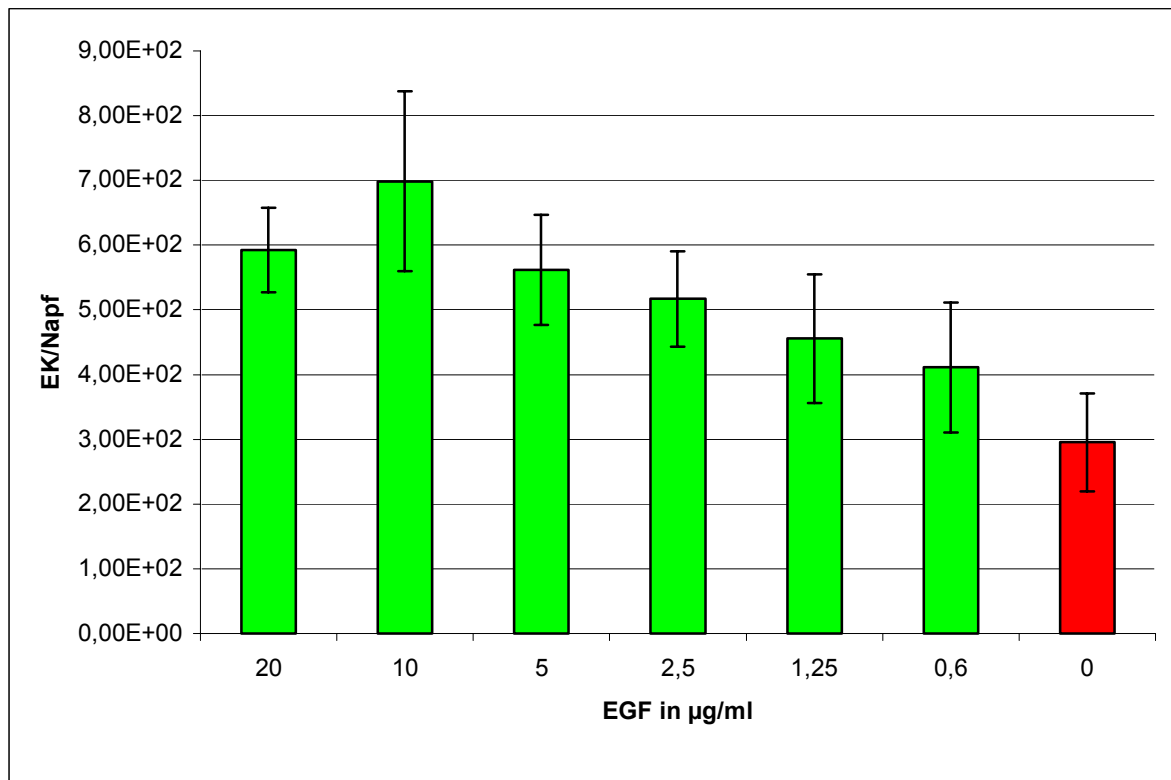


Abb. 10: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von EGF im Medium während einstündiger Vorinkubation und weiteren 6 Stunden. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Das EGF-haltige Medium wurde im Unterschied zum vorigen Versuch nur für 6 h nach der Zugabe der Chlamydien belassen. Die absoluten Werte der gebildeten Einschlusskörperchen sind um etwa den Faktor 5 kleiner als im vorherigen Versuch, in dem das EGF-haltige Medium noch 24 h belassen wurde. Maximal bilden sich unter 10µg/ml EGF 2,4 mal so viele Einschlusskörperchen aus wie in der Kontrolle. Auch hier zeigt sich, dass die Einschlusskörperchenbildung bei 20µg/ml wieder abfällt.

Steigerung der Anzahl der internalisierten Chlamydien unter dem Einfluss von EGF gegenüber der Kontrolle

	20µg/ml	10µg/ml	5µg/ml	2,5µg/ml	1,25µg/ml	0,6µg/ml
S (Versuch 3)	0,92	1,37	1,51	1,06	0,94	0,96
S (ersuch 4)	2,01	2,37	1,91	1,75	1,55	1,39
MW:	1,47	1,87	1,71	1,41	1,25	1,18
Stabw.:	7,71E-01	7,07E-01	2,83E-01	4,88E-01	4,31E-01	3,04E-01

Tab. 16: Durchschnittliche Steigerung der Internalisierung unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen EGF in der Vorinkubation und während 24/6 weiterer Stunden ohne Zentrifugation.

S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter EGF im Vergleich zur Kontrolle

MW: Mittelwert der beiden Steigerungsfaktoren

Stabw: Standardabweichung der beiden Steigerungsfaktoren

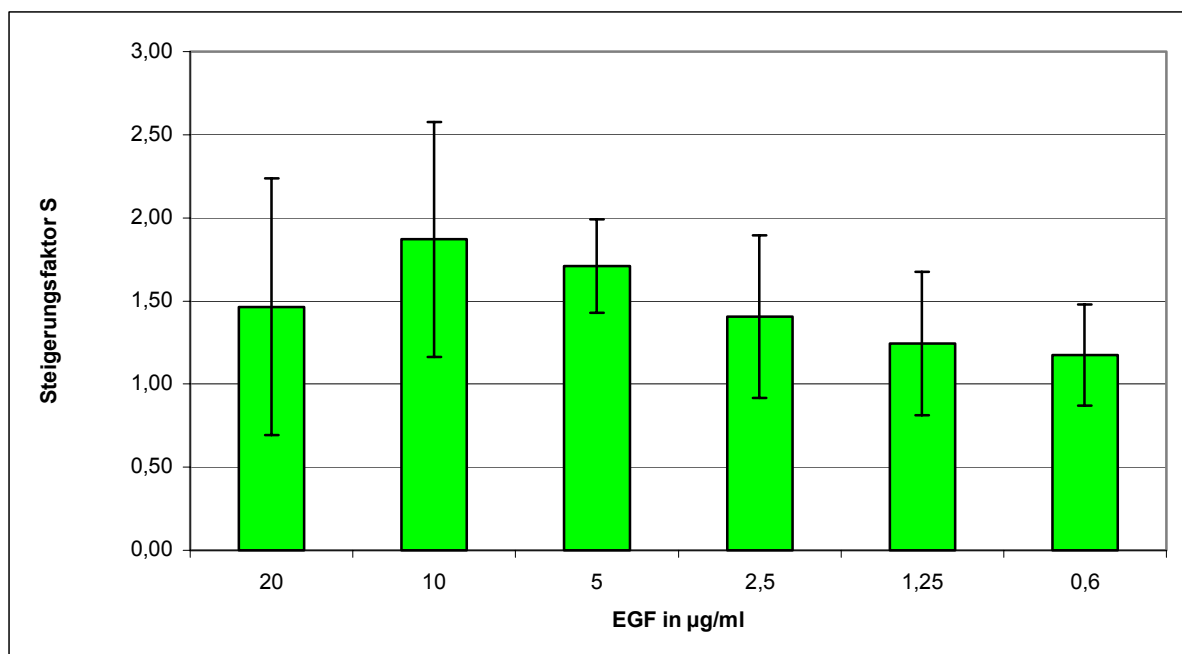


Abb. 11: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen EGF in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der beiden Steigerungsfaktoren. Der Fehlerbalken entspricht der einfachen Standardabweichung in beide Richtungen.

Die Steigerungsfaktoren der beiden Versuche ohne Zentrifugation werden gemittelt und es zeigt sich als Maximum bei 10µg/ml eine Steigerung der Einschlusskörperchenbildung um den Faktor 1,9. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im ersten Versuch das Medium noch 24 Stunden, im zweiten Versuch noch 6 Stunden nach der Vorinkubation belassen wurde und insofern die Versuchsanordnung nicht exakt gleich ist. Unter dem Einfluss von 20µl EGF /ml Medium liegt die Steigerung der Internalisierung unter dem Maximum. Die Steigerung der Internalisierung unter den jeweiligen EGF-Konzentrationen ist durchweg etwas geringer (ca. 75%) als die mit Zentrifugation.

4. 2. 3. Mit Zentrifugation der Röhrchen vor der Bebrütung

Versuch 5:

EGF-Konz.	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2,5 µg/ml	1,25 µg/ml	0,625 µg/ml	0 µg/ml
EK/DG.	8,48E+03	1,06E+04	9,61E+03	9,70E+03	7,70E+03	8,21E+03	4,68E+03
Stabw.:	1,33E+03	6,36E+02	2,30E+03	2,24E+03	1,73E+03	1,91E+03	3,83E+02
p-Wert	≤0,003	≤0,003	≤0,003	≤0,003	≤0,003	≤0,009	
Steigerungs- Faktor S	1,81	2,26	2,05	2,07	1,65	1,7	

Tab. 17: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Deckglas eines Röhrchens bei verschiedenen EGF-Konzentrationen im Medium während einstündiger Vorinkubation. Mittelwert aus jeweils vier Röhrchen.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von Röhrchen

S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter EGF im Vergleich zur Kontrolle

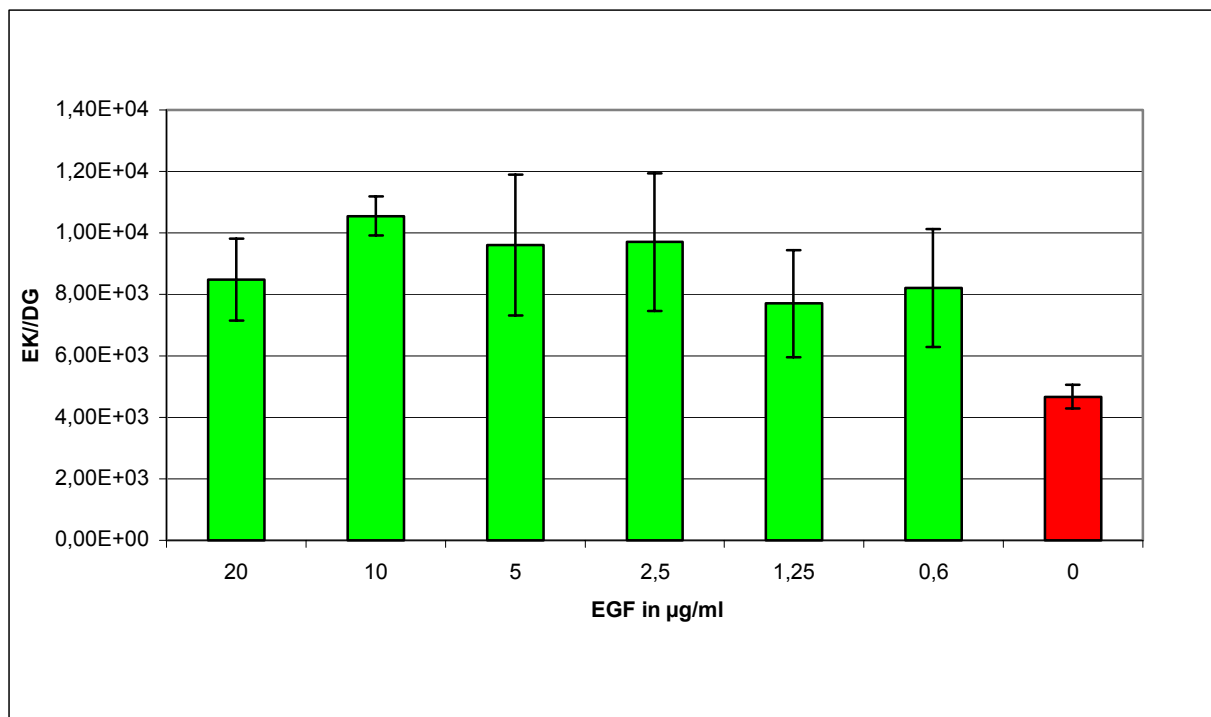


Abb. 12: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Deckglas eines Röhrchens unter verschiedenen Konzentrationen von EGF im Medium während einstündiger Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Röhrchen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

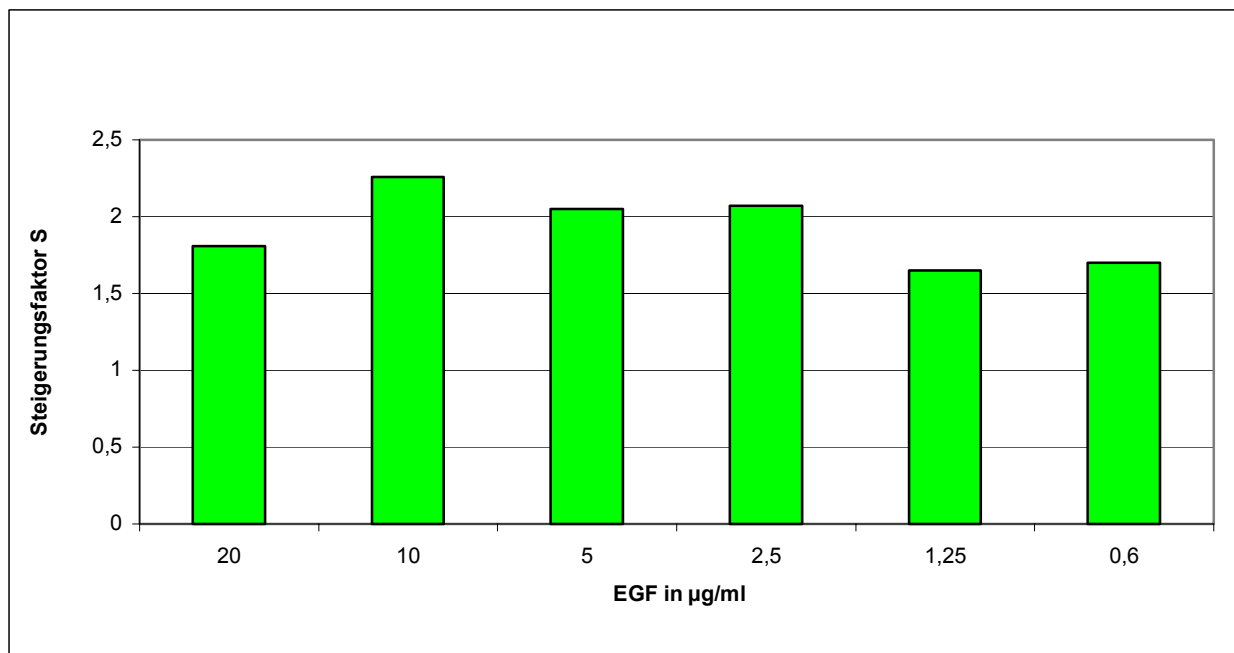


Abb. 13: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen EGF in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle.

Da sich schon in den Vorversuchen gezeigt hat, dass auch das Kulturgefäß auf die Bildung von Einschlusskörperchen einen Einfluss hat, soll nun in Zellkulturröhrchen der Einfluss von EGF auf die Internalisierung von Chlamydien getestet werden. Hier zeigt sich ein geringer Unterschied (in der Kontrolle in Mikrotiterplatten bilden 7,5%, in Zellkulturröhrchen ca. 5% der IFU einen Einschlusskörper aus). Auch hier besteht eine konzentrationsabhängige Internalisierung mit einem Maximum mit der 2,3-fachen Anzahl gebildeter Einschlusskörperchen unter dem Einfluss von 10µg EGF/ml Medium.

4. 3. Steigerung der Aufnahme von Chlamydia pneumoniae in HEp-2-Zellen durch Insulin

4. 3. 1. Mit Zentrifugation der Mikrotiterplatten vor der Bebrütung

Versuch 1:

Insulin-Konz.	1000ng/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml	0ng/ml
EK/DG.	1,90E+03	1,98E+03	2,05E+03	1,59E+03	1,86E+03	1,70E+03	1,53E+03
Stabw.:	3,27E+02	7,93E+02	3,62E+02	7,10E+02	4,55E+02	4,12E+02	4,47E+02
p-Wert	≤0,226	≤0,412	≤0,056	≤0,753	≤0,343	≤0,661	

Tab. 18: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

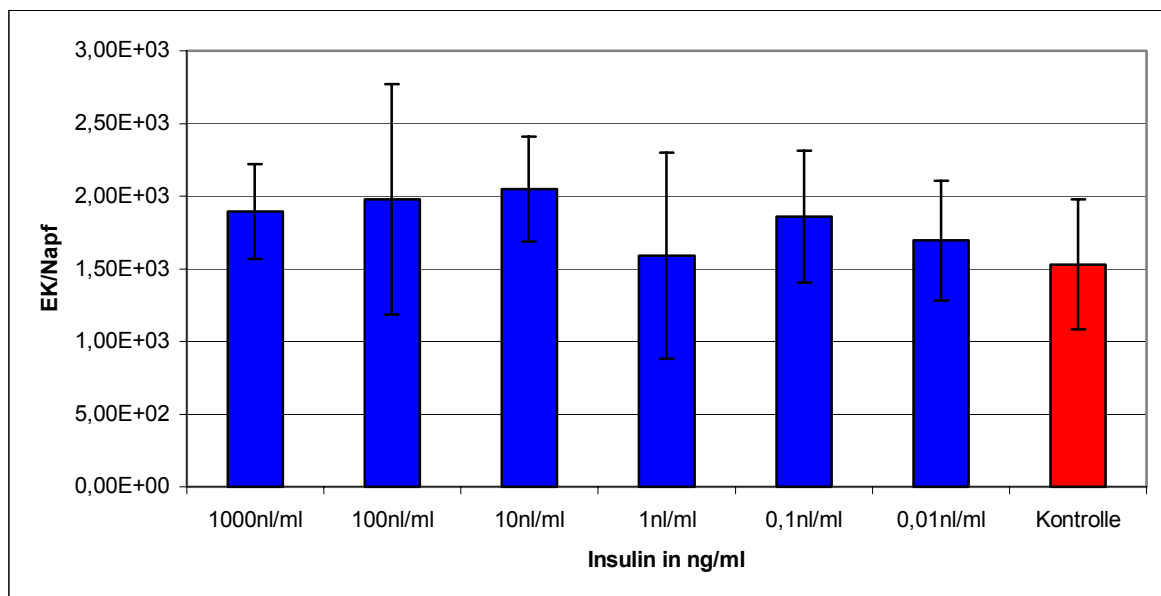


Abb. 14: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von Insulin im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Maximal beträgt die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen ca. das 1,3fache des Kontrollwertes unter 10ng/ml Insulin. Alle Werte liegen über dem Kontrollwert, wobei aber kein signifikanter Unterschied besteht.

Versuch 2:

	1000ng/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml	0ng/ml
EK/DG.	4,51E+02	4,42E+02	4,23E+02	3,33E+02	3,50E+02	4,11E+02	3,71E+02
Stabw.:	9,12E+01	9,41E+01	1,53E+02	7,32E+01	5,08E+01	8,28E+01	6,75E+01
p-Wert	≤0,082	≤0,186	≤0,465	≤0,209	≤0,681	≤0,291	

Tab. 18: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

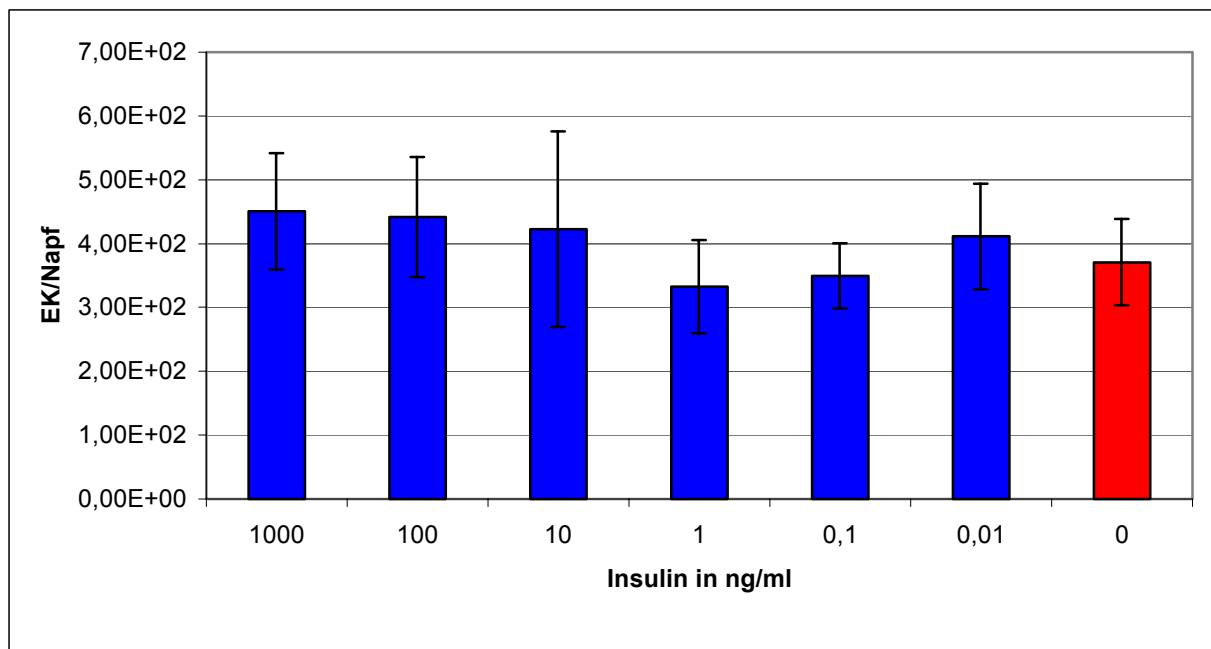


Abb. 15: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von Insulin im Medium in der einstündigen Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Hier beträgt die Steigerung das maximal das 1,2 fache des Kontrollwertes unter 1000ng/ml Insulin. Einige Werte liegen mit Insulin sogar unter dem Kontrollwert ohne Insulin in der Vorinkubation.

Ermittlung der Steigerung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörper unter Insulin gegenüber der Kontrolle

	1µg/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml
S (Versuch 1)	1,24	1,29	1,34	1,04	1,22	1,11
S (Versuch 2)	1,21	1,19	1,14	0,9	0,94	1,28
MW:	1,23	1,24	1,24	0,97	1,08	1,20
Stabw.	2,12E-02	7,07E-02	1,41E-01	9,90E-02	1,98E-01	1,20E-01

Tab. 19: Durchschnittliche Steigerung der Internalisierung unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Insulin in der Vorinkubation.

S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter Insulin im Vergleich zur Kontrolle

MW: Mittelwert der beiden Steigerungsfaktoren

Stabw: Standardabweichung der beiden Steigerungsfaktoren

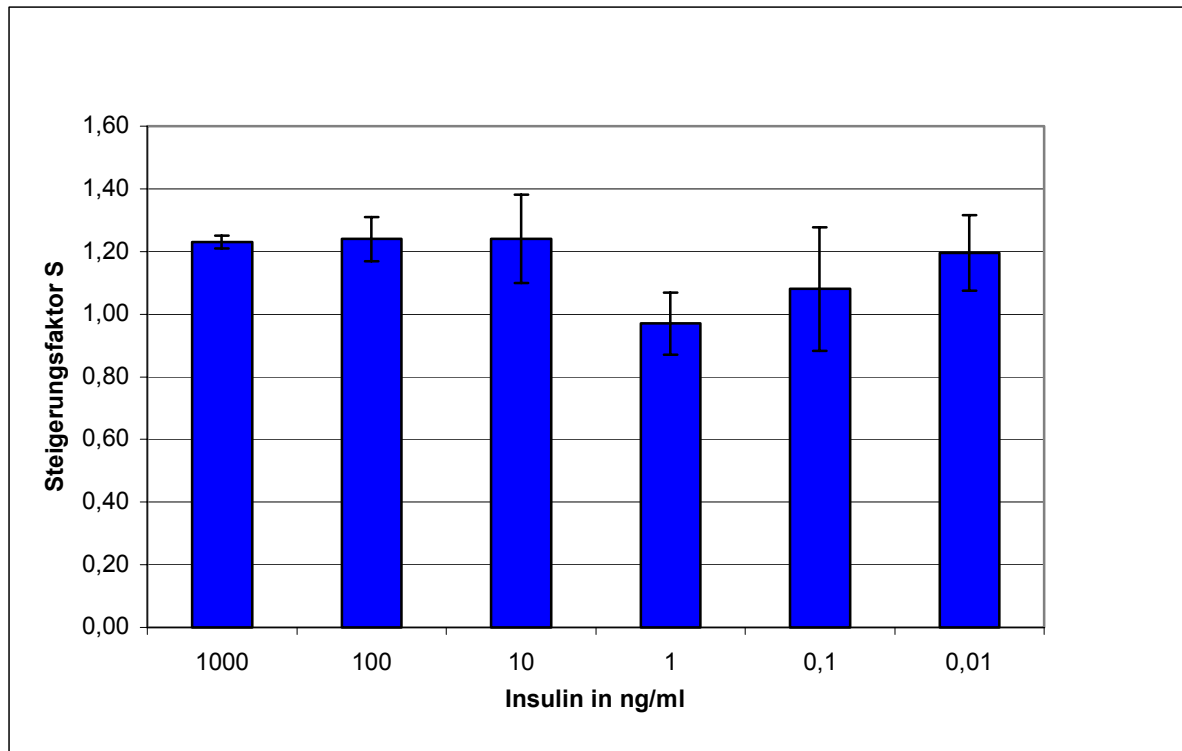


Abb. 16: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen Insulin in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der beiden Steigerungsfaktoren. Der Fehlerbalken entspricht der einfachen Standardabweichung in beide Richtungen.

Die Bildung von Einschlusskörperchen unter Insulin wird durch Insulin in den Konzentrationen 1000 und 10 ng/ml um maximal das 1,24 fache gesteigert. Eine Steigerung der Internalisierung mit der steigenden Insulindosis ist nicht erkennbar.

4. 3. 2. Ohne Zentrifugation der Mikrotiterplatten vor der Zentrifugation

Versuch 3:

	1000ng/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml	0ng/ml
EK/DG.	1,69E+03	1,70E+03	1,46E+03	1,57E+03	1,56E+03	1,67E+03	1,54E+03
Stabw.:	2,33E+02	1,10E+02	1,88E+02	1,90E+02	1,91E+02	2,59E+02	2,96E+02
p-Wert	≤0,521	≤0,446	≤0,446	≤0,945	≤0,953	≤0,599	

Tab. 20: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Medium in der einstündigen Vorinkubation und weiteren 24 Stunden. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

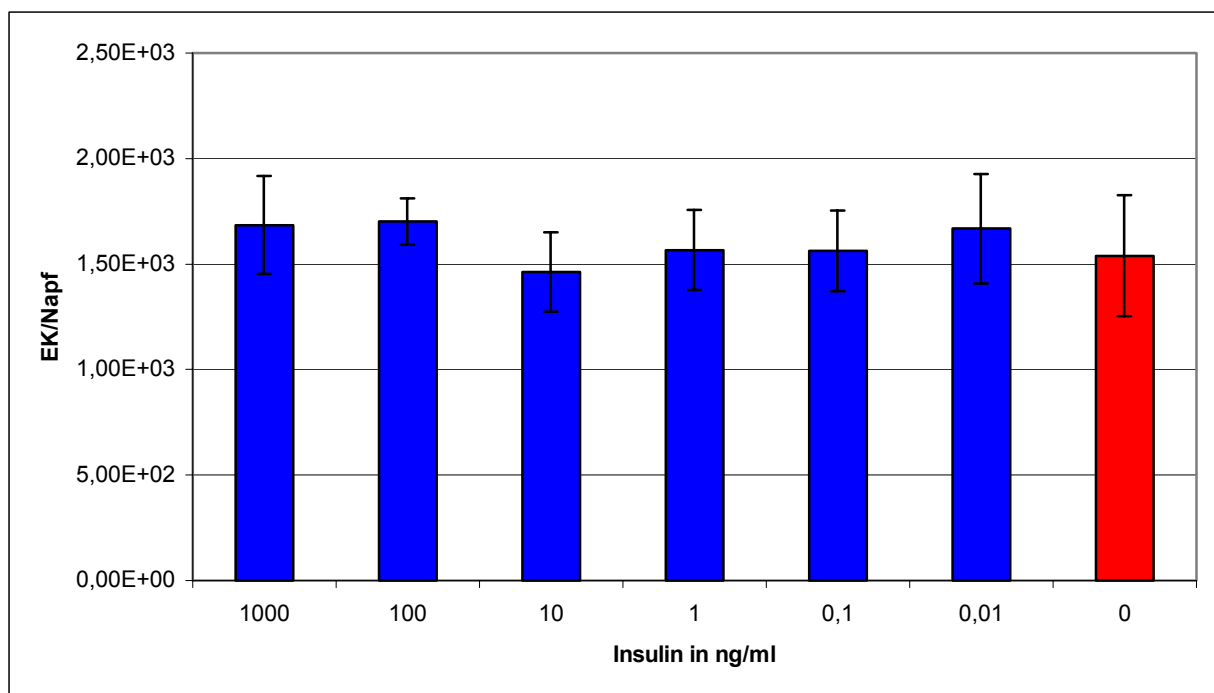


Abb. 17: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von Insulin im Medium in der einstündigen Vorinkubation und weiteren 24 Stunden. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Eine Steigerung der Internalisierung unter der Wirkung von Insulin ist nicht erkennbar.

Versuch 4:

	1000ng/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml	0,01ng/ml
EK/DG.	3,56E+02	4,01E+02	3,19E+02	3,84E+02	3,60E+02	2,81E+02	2,95E+02
Stabw.:	5,25E+01	1,10E+02	4,39E+01	7,34E+01	1,08E+02	7,95E+01	7,55E+01
p-Wert	≤0,099	≤0,148	≤0,682	≤0,099	≤0,953	≤0,750	

Tab. 21: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Medium in der einstündigen Vorinkubation und weiteren 6 Stunden. Mittelwert aus vier Näpfen einer Mikrotiterplatte.

Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von vier Näpfen

U-Test nach Mann und Whitney, zweiseitig.

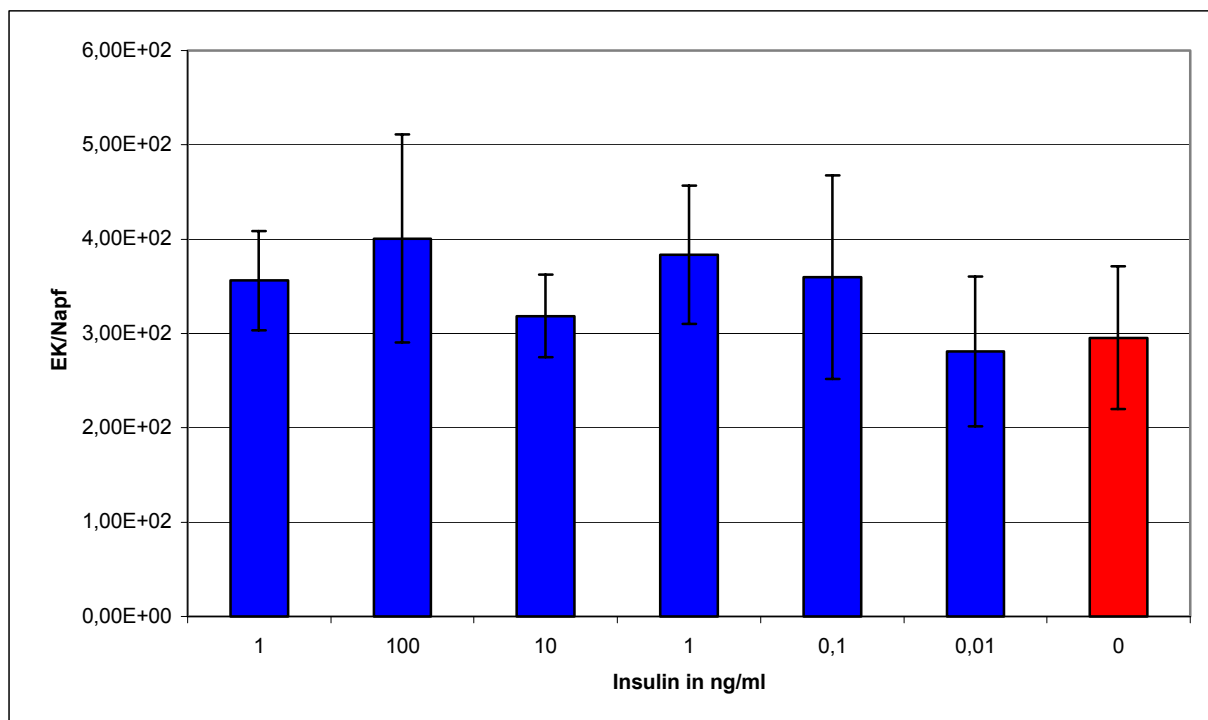


Abb. 18: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Napf unter verschiedenen Konzentrationen von Insulin im Medium in der einstündigen Vorinkubation und weiteren 6 Stunden. Mittelwert aus je vier Näpfen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Ermittlung der Steigerung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörper unter Insulin gegenüber der Kontrolle

	1µg/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml
S (Versuch 3)	1,20	1,10	0,95	1,02	1,01	1,08
S (Versuch 4)	1,21	1,36	1,08	1,3	1,22	0,95
MW:	1,15	1,23	1,02	1,16	1,12	1,02
Stabw.:	8,49E-02	1,84E-01	9,19E-02	1,98E-01	1,48E-01	9,19E-02

Tab. 22: Durchschnittliche Steigerung der Internalisierung unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Insulin in der Vorinkubation und während 24/6 weiterer Stunden ohne Zentrifugation.

S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter Insulin im Vergleich zur Kontrolle

MW: Mittelwert der beiden Steigerungsfaktoren

Stabw: Standardabweichung der beiden Steigerungsfaktoren

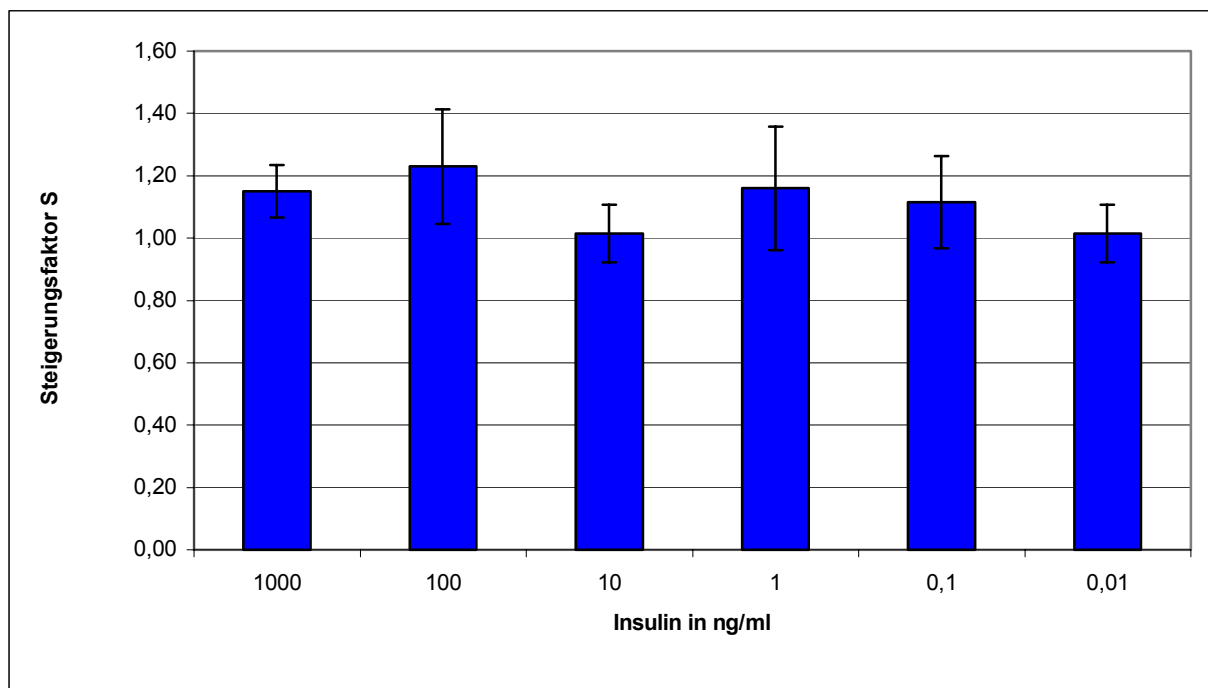


Abb. 19: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen Insulin in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der beiden Steigerungsfaktoren. Der Fehlerbalken entspricht der einfachen Standardabweichung in beide Richtungen.

Die Steigerung der Einschlusskörperchenbildung erreicht maximal den 1,23fachen Wert unter 100ng/ml Insulin gegenüber der Kontrolle.

4. 3. 3. Mit Zentrifugation der Röhrchen vor der Bebrütung

Versuch 5:

	1000ng/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	0,1ng/ml	0,01ng/ml	0,01ng/ml
EK/DG.	5,01E+03	5,28E+03	5,44E+03	4,57E+03	3,91E+03	3,94E+03	4,68E+03
Stabw.:	6,16E+02	6,59E+02	6,91E+02	5,08E+02	2,30E+02	5,54E+02	3,99E+02
p-Wert	≤0,368	≤0,109	≤0,109	≤0,808	≤0,008	≤0,073	
Steigerungs- -faktor S	1,06	1,125	1,15	0,97	0,83	0,84	

Tab. 23: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Deckglas eines Röhrchens bei verschiedenen EGF-Konzentrationen im Medium während einstündiger Vorinkubation. Mittelwert aus jeweils vier Röhrchen.
Stabw: Standardabweichung der Mittelwerte von Röhrchen
S: Steigerungsfaktor der Internalisierung unter EGF im Vergleich zur Kontrolle

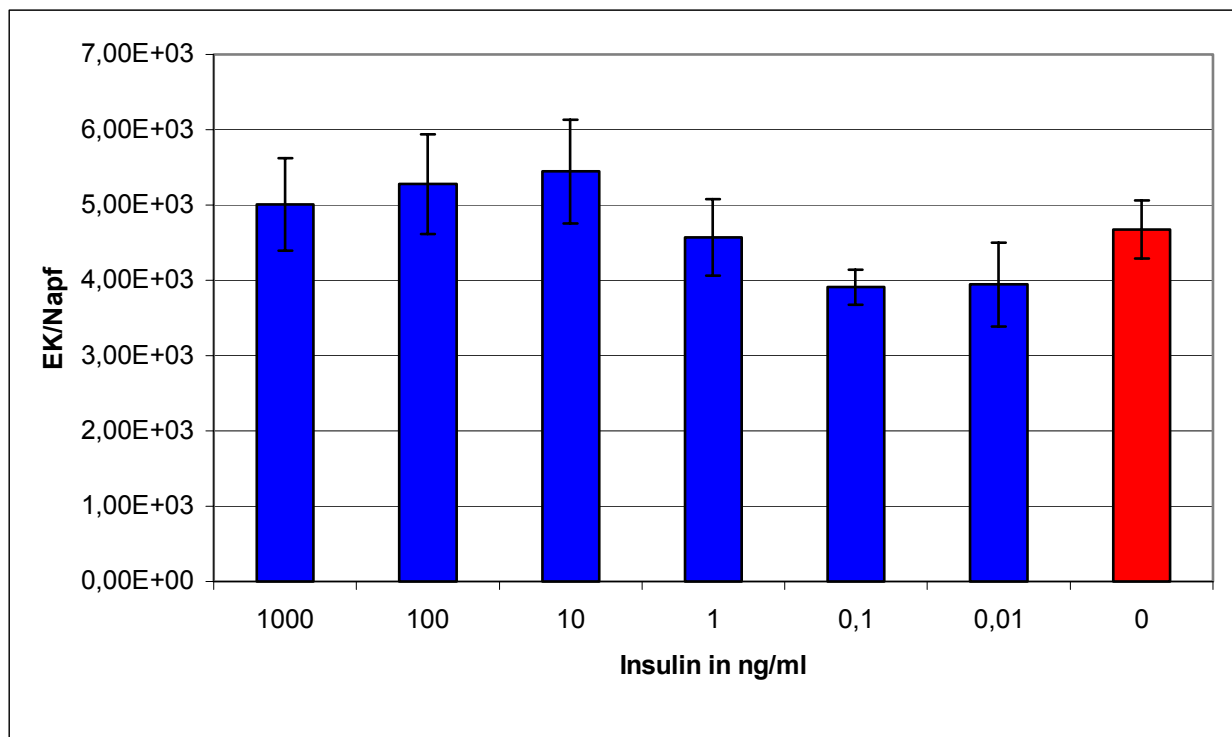


Abb. 20: Anzahl der gebildeten Einschlusskörperchen pro Deckglas eines Röhrchens unter verschiedenen Konzentrationen von Insulin im Medium während einstündiger Vorinkubation. Mittelwert aus je vier Röhrchen. Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen.

Ermittlung der Steigerung der Anzahl der gebildeten Einschlusskörper unter Insulin gegenüber der Kontrolle

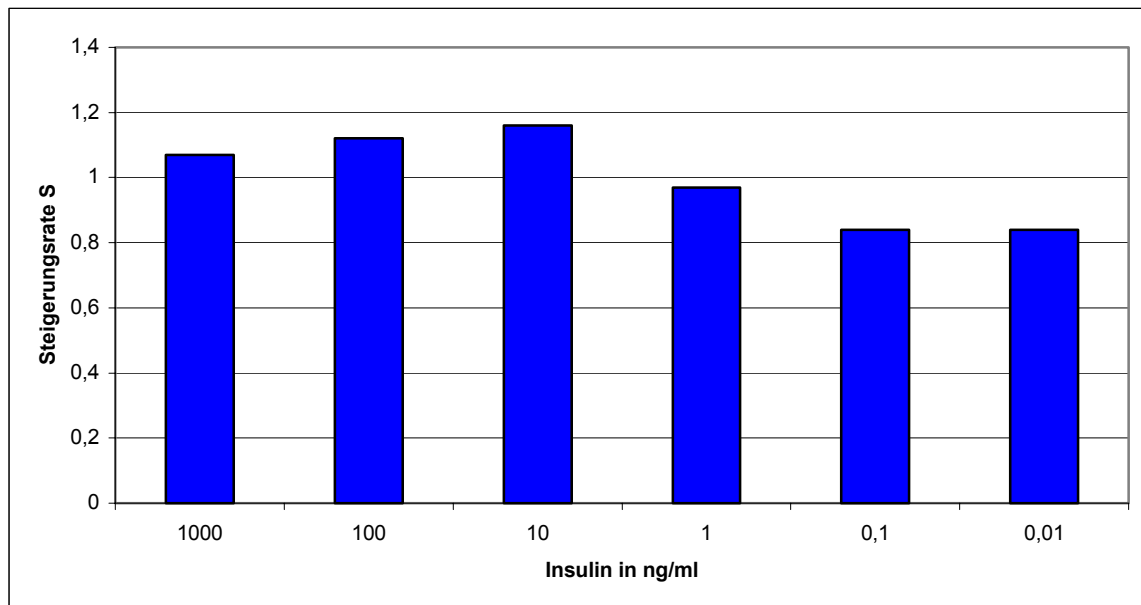


Abb. 21: Steigerung der Einschlusskörperchenbildung unter verschiedenen Konzentrationen Insulin in der Vorinkubation im Vergleich zur Kontrolle.

Hier ist eine Steigerung der Zahl der IFUs unter Insulin von bis auf das 1,15fache zu erkennen. Das Maximum liegt bei 10 ng/ml, danach fällt die Zahl mit fallender Insulinkonzentration bis auf Werte unter dem Kontrollwert ab.

5. Diskussion

5. 1. Planung der Hauptversuche aufgrund der Ergebnisse aus den Vorversuchen

Um genauere Kenntnisse über den Weg der Internalisierung von *C. pneumoniae* zu erhalten, gehen wir in der vorliegenden Arbeit der Frage nach, ob und welche Rolle Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren dabei spielen. Um ihren Einfluss genau erfassen zu können, wird eine zuverlässige Versuchsanordnung benötigt, die im Vorfeld erarbeitet wurde. Die Isolation von *C. pneumoniae* aus Patientenproben hat sich im Vergleich zu der anderer Chlamydien als schwierig herausgestellt. Auch in der Zellkultur gelingt die Vermehrung nicht so gut wie die von *C. trachomatis*. Ein Vitalitätsverlust der Organismen ist häufig, und wenn sich Einschlusskörperchen ausbilden, sind diese oft nur klein. Um eine Versuchsanordnung zu entwerfen, die zum einen die optimalen Bedingungen für die Kultur von *C. pneumoniae* berücksichtigt und zum anderen die Steigerung der Internalisierung der Chlamydien durch verschiedene Einflussfaktoren zeigen kann, wurden zunächst Vorversuche zu verschiedenen Fragestellungen durchgeführt.

5. 1. 1. Auswahl der Zelllinie

Eine bedeutende Rolle für das Ausmaß der Bildung von Einschlusskörperchen spielt die Art der benutzten Zellen. Üblicherweise werden für die Kultur und die Vermehrung von *C. pneumoniae* in diesem Institut BGM-Zellen verwendet. Daher wissen wir, dass bei der Verwendung einer Verdünnung des Ausgangsaliquots ($3,0 \times 10^9$ IFU/ml) für die Infektion von BGM-Zellen nach einer einstündigen Zentrifugation mit 4000g theoretisch alle zugegebenen Chlamydien internalisiert werden und die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen der Anzahl der zugegebenen vermehrungsfähigen Organismen entspricht. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Anzahl der im Ausgangsaliquot enthaltenen IFUs mit BGM-Zellen bestimmt wurde. In unserem Versuch mit BGM-Zellen zeigte sich jedoch, dass bei einstündiger Zentrifugation mit 4000g die maximale Anzahl der Einschlusskörperchen über der experimentell ermittelten Anzahl der eingesäten IFU ($8,00 \times 10^4$) liegt. Erklärt werden kann dies dadurch, dass möglicherweise mehr Chlamydien in der Ausgangssuspension vorliegen, diese aber nicht immer alle einschlussbildend sind. Unwahrscheinlicher ist, dass bis zum Zeitpunkt der Auszählung der Einschlusskörperchen eine weitere Vermehrung stattgefunden hat, denn alle Einschlusskörperchen haben nach der Inkubationszeit von 72h nahezu dieselbe Größe und schon geplatzte Wirtszellen führen zu einer sichtbaren Streuung der einzelnen neu entstandenen Chlamydien.

Es wird in dieser Arbeit eine Versuchsanordnung erarbeitet, in der die Wirkung von humanen Wachstumsfaktoren auf die Internalisierung von *C. pneumoniae* in Zielzellen erfasst werden kann. Daher soll eine Zelllinie humanen Ursprungs verwendet werden.

HEp-2-Zellen werden als epidermale Zellen aus dem menschlichen Respirationstrakt angesehen. Ihre Empfänglichkeit für *C. pneumoniae* ist gut (Wong et al. 1992).

Allerdings besteht der Verdacht, dass die HEp-2-Zelllinie teilweise mit HeLa Zellen kontaminiert wurde. Dies schränkt aber nicht ihre Eignung für die Kultur von Chlamydien ein (Kenny, 1993). In Untersuchungen zur Kultur von *C. pneumoniae* TW-183

auf verschiedenen Zellen, darunter HeLa 229, McCoy, HL, HEp-2- und HTED (humane Trachealzelllinie) Zellen, zeigten HEp-2-Zellen die beste Empfänglichkeit. In ihnen wurden 1 bis 2 log Stufen mehr Einschlusskörperchen ausgebildet als in den anderen Zelllinien (Roblin, 1992).

Es kann nicht ohne Weiteres vorausgesetzt werden, dass in HEp-Zellen ebenfalls wie in BGM-Zellen alle IFU ein Einschlusskörperchen bilden. Versuche zeigen, dass hier bei gleicher Infektionsrate nur etwa ein Viertel so viele Einschlusskörperchen wie in BGM-Zellen ausgebildet werden. Außerdem fällt auf, dass die in HEp-2-Zellen ausgebildeten Einschlusskörperchen kleiner sind.

5. 1. 2. Beeinflussung der Internalisierung durch Auswahl der geeigneten Zentrifugationsdauer und Beschleunigung

Um eine Steigerung der Internalisierung zeigen zu können, müssen noch genügend „freie“ Zellen und überschüssige Chlamydien zur Verfügung stehen.

Eine Möglichkeit, die Internalisierung zu vermindern, ist die Verringerung der Zentrifugationsdauer und der g-Zahl nach der Beimpfung der Zellen mit der Chlamydiensuspension.

In den Versuchen zeigte sich, dass das Ausmaß der Internalisierung im Bereich der Zentrifugationsdauer bis zu 15 Minuten am effektivsten beeinflusst werden kann.

Zu Beginn der Zentrifugation steigt die Rate der gebildeten Einschlusskörperchen am schnellsten an. Nach 15 Minuten werden deutlich weniger Einschlusskörperchen pro Zeiteinheit gebildet. Somit ist eine maximale Beeinflussung über die Zeit vor allen zu Beginn der Zentrifugation möglich. Bei 15minütiger Zentrifugation mit 4000g werden auf BGM-Zellen noch ca. 70% der maximal möglichen Einschlusskörperchen ausgebildet.

In Untersuchungen mit *C. psittaci* strain G-PIC auf McCoy-Zellen konnte gezeigt werden, dass nach 20 Minuten Zentrifugation die Anlagerung der Chlamydien an die Zellen nicht mehr zu einer Internalisierung führte. Als Ursache wurde ein dann auftretender refraktärer

Zustand der Zellen diskutiert. Möglicherweise liegt die Ursache in einer Veränderung der Zahl oder des Zustandes der Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche (Allan and Pearce, 1978).

Für die Zentrifugationsbeschleunigung zeigt sich die maximale Beeinflussbarkeit der Internalisierung zwischen 0 und 1000g. Die Steigerung der Internalisierung durch einstündige Zentrifugation mit 1000g gegenüber der einstündigen Bebrütung ohne Zentrifugation beträgt etwa das 400fache. Eine Beschleunigung über 1000g bringt auf BGM-Zellen nur noch einen geringen Zuwachs gebildeter Einschlusskörperchen ($9,08 \times 10^4$ gegenüber $10,10 \times 10^4$ EK/DG bei 2000g und $9,78 \times 10^4$ EK/DG bei 4000g).

Zur Wirkung der Zentrifugation gibt es verschiedene Überlegungen:

1. Spreizung der Zellen und daraus resultierend eine bessere Verfügbarkeit der Rezeptoren an der Zelloberfläche z. B. dadurch, dass Rezeptoren oder Zelloberflächenstrukturen aus Invaginationen der Zelloberfläche in gut zugängliche Teile der Zelloberfläche gelangen.
2. Die Wirkung der Fliehkraft kann möglicherweise aber zu einer Lageveränderung intrazellulärer Strukturen, z. B. des Zellkernes und dadurch zur Polarisierung der Zellen führen. Möglicherweise verändert dies die Fähigkeit der Zellen, Chlamydien zu internalisieren.
3. Änderung der Interaktion zwischen Zelle und Chlamydie im Vergleich zur spontanen Interaktion: Spontane Infektion ist in Versuchen durch Antikörper zu blockieren, nicht aber die unter Zentrifugation (Allan et al., 1977). Das spricht für eine Förderung der Internalisierung durch unspezifische Mechanismen, z. B. Veränderung der Ladungsverhältnisse der Oberflächen.
4. Stressreaktionen der Zellen und dadurch Ausbildung/Externalisierung von Rezeptoren oder Zelloberflächenmolekülen oder Synthese/Exkretion von Stresshormonen im weitesten Sinne, z. B. EGF, die parakrine oder autokrine Wirkungen haben.
5. Physikalische Wirkung der Zentrifugalkraft auf die Chlamydien und dadurch ihre Sedimentation auf den Zellrasen. Diese früher übliche Meinung ist als unwahrscheinlich anzusehen, da schon Kräfte unter 1000g einen deutlichen Effekt auf die Internalisierung haben und aufgrund der Kleinheit der Organismen (ca. 300 nm) die Sedimentation von Chlamydien erst ab wesentlich höheren Kräften zu erwarten ist.

$8,0 \times 10^4$ Chlamydien pro Röhrchen bilden auf HEp-2-Zellen nach einstündiger Zentrifugation mit 4000g $2,5 \times 10^4$ Einschlusskörperchen pro Deckglas aus. Damit bilden etwa 31% der IFU einen Einschluss aus.

$1,19 \times 10^4$ EK/DG, also etwa die Hälfte davon, werden durch eine 15 minütige Zentrifugation mit 1000g ausgebildet. Diese Zahlen gelten für Versuche in Zellkulturröhrchen.

Nach unseren Versuchen bilden bei einer Infektionsrate von 0,5 IFU/Zelle in Mikrotiterplatten unter Bedingungen der serumfreien Inkubation in den letzten 24h nur ca. 10% der Chlamydien einen Einschluss aus, nach 48 Stunden im serumhaltigen Medium ca.4%. In unseren Versuchen werden unstimuliert ca. 10% der Einschlusskörperchen internalisiert. Theoretisch ist eine Steigerung der Internalisierung um den Faktor 10 in unserer Versuchsanordnung möglich.

Es gibt nur wenige Untersuchungen über die Modulation der Internalisierung von *C. pneumoniae* durch die Dauer und Beschleunigung der Zentrifugation. Höhere Zentrifugalkräfte (1700g gg.900g) steigerten die Internalisierung um bis zum 3,6fachen auf HeLa Zellen (Kuo et al., 1988). Eine Arbeit von Tjhie zeigt eine Steigerung der Einschlusskörperchenbildung nach wiederholter Zentrifugation im Abstand von zwei Tagen, welche wohl am ehesten auf die Internalisierung neu entstandener IFU basiert (Tjhie, et al., 1997).

5. 1. 3. Auswahl des Mediums zur Zellkultur und Beimpfung bzw. Inkubation der Chlamydien

Wachstumsfaktoren im serumhaltigen Medium können einen Einfluss auf die Internalisierung und Einschlusskörperchenbildung von *C. pneumoniae* in Zellen haben. Da dieser nicht quantifizierbar ist, wurde versucht, diesen Einfluss so weit wie möglich zu minimieren. Wird nach der Einsaat der Zellen in die Röhrchen bzw. Näpfe der Mikrotiterplatte nur serumfreies Medium verwendet, bildet sich kein geschlossener Zellrasen aus. Die Zellen runden sich ab und sind nicht mehr an der Oberfläche des Gefäßes adhärent, was als Zeichen eines Vitalitätsverlustes gewertet wird.

Daher wurden die Zellen für die folgenden Versuche in den ersten 24 h nach Einsaat in serumhaltigem Medium gehalten und dieses dann für die weiteren 24 h der Vorinkubation durch serumfreies ersetzt.

Wurde in Mikrotiterplatten 24h vor der Einsaat serumfreies Medium verwendet, so wurden bei $4,0 \times 10^4$ eingesäten IFUs pro Napf nach Zentrifugation mit 1000g über 15 Minuten $3,71 \times 10^3$ Einschlusskörperchen ausgebildet. Das entspricht ca. 9%. Im Vergleich dazu werden nach

Inkubation im serumhaltigen Medium nur $1,61 \times 10^3$ EK/DG gebildet, was etwa 4% entspricht.

Auffällig ist der Unterschied der um über das Doppelte höheren Internalisierungsrate durch eine serumfreie Haltung der Zellen in den letzten 24 h vor der Beimpfung. Man kann für diesen Effekt verschiedene Gründe vermuten:

1. Die Haltung im serumfreien Medium stellt für die Zellen einen Stressfaktor dar, der sie möglicherweise zur vermehrten Synthese von „eigenen“, effektiveren Wachstumsfaktoren oder zur Expression von Rezeptoren oder Zelloberflächenmolekülen anregt.
2. Das Fehlen von Wachstumsfaktoren reduziert die Teilung und Proliferation der Zellen und stellt so den Chlamydien mehr Substrat (z. B. Zytoskelettstrukturen, Baustoffe, Rezeptoren) zur Verfügung als Zellen, die sich in der Wachstumsphase befinden. Die Behandlung von Zellen mit Mitomycin konnte die Sensitivität von McCoy-Zellen *C. trachomatis* gegenüber erhöhen. Vermutlich basiert dies auch auf einem hemmenden Effekt auf die Zellteilung (Woodland et al., 1987)
3. Die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Zellen über einen längeren Zeitraum resultiert in einer Downregulation der Rezeptoren und Oberflächenstrukturen auf der Zelle und vermindert damit die Sensitivität auf diese Einflüsse.
4. Auch eine Elektrolytverschiebung könnte die Internalisierung beeinflussen.
5. Inhibitorische Effekte durch das Tierserum können nicht ausgeschlossen werden.

Eine Arbeit von Maass (Maass et al., 1993) zeigt, dass im serumfreiem Medium eine 10 bis 50fach gesteigerte Empfänglichkeit von HL-Zellen für eine Infektion mit *C. pneumoniae* besteht.

5. 1. 4. Einfluss von PEG

Es soll für unsere Versuchsanordnung damit gezeigt werden, dass eine Steigerung der Internalisierung der Chlamydien in die Zellen praktisch möglich ist.

Unter dem Einfluss von 7% EGF im Medium steigerte sich die Internalisierung von *C. pneumoniae* in HEp-2 Zellen auf das doppelte bis fünffache. Konzentrationen über 10,5% waren zelltoxisch. (Tjhie et al., 1997, Gibson et al., 1993).

Berlau konnte eine Steigerung von 1,3 in HL-Zellen und von zwei bis sieben mal mehr Internalisierungen in synovialen Zellen zeigen (Berlau et al., 1996).

Dieser Effekt resultiert möglicherweise daraus, dass die Hydrophobie der Zellmembran durch das PEG gesteigert wird, die Fusion von Zellmembranen erleichtert ist und so die Aufnahme der Chlamydien in die Zellen gesteigert ist (Allan and Pearce, 1978).

In unseren Versuchen steigert die Konzentration von 10% PEG im Medium während der Zentrifugation die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen maximal. Höhere PEG-Konzentrationen haben einen toxischen Effekt auf die Zellen, die Einschlusskörperchenbildung fällt darunter wieder ab. Maximal wird die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen um ca. ein Drittel (ohne Actidion) bzw. ein Viertel (mit Actidion) gesteigert.

5. 1. 5. Einfluss von Actidion

Es stellt sich die Frage, ob die Internalisierung von Chlamydien einer Proteinsynthese bedarf oder ob alle dafür benötigten Komponenten in der Zelle schon präformiert vorhanden sind. Um einen eventuellen proteinsyntheseabhängigen Prozess bei der Internalisierung der Elementarkörperchen zu hemmen, wird ein Teil der Näpfe während der Zeit der Inkubation nach Zugabe der Chlamydien und Zentrifugation mit actidionhaltigem Medium versetzt.

Eine Reduktion der Internalisierung der Chlamydien um 15 bis 34% im Vergleich mit den Ansätzen mit gleicher PEG-Konzentration ohne Actidion wurde beobachtet.

Diese nur relativ geringe Hemmung der Internalisierung passt zu den derzeitigen Erklärungsmodellen der Aufnahme von Chlamydien und zur kurzen Zeitspanne von ca. 15-20 Minuten, in der ein großer Teil der Chlamydien internalisiert wird. In dieser Zeit ist eine Proteinsynthese unwahrscheinlich. Auch die Aktin bindenden Proteine Profilin und Gelsolin liegen nach Forscher schon in der ruhenden Zelle vor und werden lediglich durch die Rezeptorstimulation aktiviert (Forscher, 1989).

Der geringe negative Effekt des Actidion auf die Internalisierung der Chlamydien ist mit den gängigen Vorstellungen der Internalisierung nicht zu erklären. Möglich ist aber eine Wirkung über die Hemmung des Stoffwechsels oder der Teilungsfähigkeit der Zelle, die sich auf die Entwicklungsbedingungen der Chlamydien in der Zelle negativ auswirken.

5. 2. Versuchsaufbau und Fehlermöglichkeiten

Aus den Ergebnissen der Vorversuche und der Erfahrungen aus der Literatur wird nun ein Versuchsmodell erstellt, welches einen Einfluss von Wachstumsfaktoren wie EGF und Insulin quantitativ erfassbar machen soll.

Als humane epidermoide Zellen werden HEP-2-Zellen verwendet. In Mikrotiterplatten mit 96 Näpfen und je $4,0 \times 10^4$ Zellen pro Napf finden alle Ansätze Platz. So bestehen bis auf die Variable der Wachstumsfaktorkonzentration gleiche Versuchsbedingungen von Ansätzen, die miteinander verglichen werden.

Nach der Bebrütung, nach jedem Medienwechsel und vor der Einsaat der Chlamydien wurde der Zellrasen optisch auf seine Vitalität überprüft. Auch nach Fixierung und Färbung der Zellen wurde kontrolliert, ob der Zellrasen intakt ist. So wurden Fehler durch Avitalität der Zellen, durch Mehrfachlagen oder durch Beschädigung des Zellrasens minimiert.

Nach Auftauen der Chlamydien wurde für eine rasche Verarbeitung gesorgt, da bekannt ist, dass Chlamydien bei Zimmertemperatur rasch avital werden können und dies zu einer Titerreduktion führen könnte (Schneider, 1986).

Ein Verhältnis von 1 bis 5 IFU pro Zelle hat sich in vorhergehenden Arbeiten als optimal für die Vermehrung von Chlamydien gezeigt (Meijer et al., 1996). In unseren Versuchen hat sich bestätigt, dass $4,0 \times 10^4$ IFU pro Napf, also eine Chlamydie pro Zelle, eine geeignete Anzahl für die Ausbildung von Einschlusskörperchen und die zuverlässige Auswertung darstellt. Fehler durch die Mehrfachinfektion einer Zelle oder durch die Avitalität von einzelnen Zellen können so vermindert werden.

Da wir nun damit rechnen, dass eine Steigerung der Internalisierung erfolgt, haben wir die Zahl der eingesäten Chlamydien in den Hauptversuchen halbiert. Das heißt, wir verwenden $2,0 \times 10^4$ IFU pro Napf bei $4,0 \times 10^4$ Zellen pro Napf.

Wenn man von einer Internalisierung von ca. 10% der Chlamydien wie in den Vorversuchen ausgeht, rechnen wir mit ca. $2,0 \times 10^3$ Einschlusskörperchen pro Napf ohne die Wirkung von Wachstumsfaktoren. Ein ausreichender Überschuss an Chlamydien ist dann noch vorhanden, um eine eventuelle Wirkung aufzuzeigen. Diesen stehen dann auch genügend Zellen zur Verfügung.

Wie bei allen Versuchsanordnungen, bei denen mit geringen Mengen gearbeitet wird, können sich beim Abmessen der Stoffe (EGF, Insulin, Chlamydien suspension) Messfehler einstellen. Es wurde mit Mikropipetten der Firma Eppendorf und Pipettierkonen in der Größe 1 bis 1000 µl gearbeitet. Genaue Angaben zum Pipettierfehler werden vom Hersteller zur elektronischen Pipette des Typ Eppendorf Response/Multichannel gemacht. Hier liegt der systematische und zufällige Fehler bei der Verwendung der 10 µl-Einstellung bei je +/- 2%, bei der 100 µl Einstellung beträgt der systematische Fehler 0,8, der zufällige Fehler 2,5%. Die elektronische Pipette wurde benutzt, um die Chlamydien suspension auf die vorinkubierten Zellen zu übertragen. In den Hauptversuchen werden, um das bereits zur Vorinkubation der Zellen für eine Stunde verwendete wachstumsfaktorhaltige Medium belassen zu können, 10 µl einer 10fach höher konzentrierten Chlamydien suspension zugegeben.

Es wurden Versuche mit Zentrifugation der beimpften Zellen durchgeführt. Dabei wurde eine Zentrifugationsdauer von 15 Minuten und eine g-Zahl von 1000 gewählt, da sich gezeigt

hatte, dass durch Steigerung eine viel effektivere Wirkung auf die Internalisierung nicht zu erwarten ist. Eine möglichst kurze Zeit der Zentrifugation mit möglichst wenig Beschleunigung wurde gewählt, um die Einflüsse auf die Zellen und Chlamydien durch diese Prozedur minimal zu halten. Um unspezifische Einflüsse durch die Zentrifugation ganz auszuschalten, wurden auch Versuche ohne Zentrifugation durchgeführt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Zahl der gebildeten Einschlusskörperchen nach einstündiger Zentrifugation mit 1000g ca. 400 mal höher ist als die ohne Zentrifugation. Wir wählten für die Versuche ohne Zentrifugation die Zahl von $1,5 \times 10^6$ IFU pro Napf.

Ein Versuch wurde in Zellkulturröhrchen durchgeführt, um die Wirkung der Wachstumsfaktoren auch in einem anderen Versuchssystem zu zeigen. Parallel zu den Versuchen in Mikrotiterplatten wurden immer vier Näpfe mit derselben Konzentration von EGF und Insulin behandelt. Die Kontrolle umfasst mindestens 12 Proben.

Die Einschlusskörperchen werden nach der Bebrütung (72 h) und der Fixierung mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper angefärbt. Durch die Kontrastierung des Zellrasens mit Evans-Blue wird die Auszählung erleichtert. Es werden pro Napf 10 Gesichtsfelder ausgezählt und zwar quer durch das Präparat, um möglichst alle Regionen dort repräsentiert zu haben. Teilweise erfasste Einschlusskörperchen am Rand werden zur Hälfte, schon geplatzt werden komplett mitgezählt. Da bei abnehmender Objektivvergrößerung die anteilmäßige Fläche des Napfbodens, welche erfasst wird, geringer ist, wird die Zählung weniger repräsentativ. Andererseits wird die Zählung ungenau, wenn sich in einem Gesichtsfeld zu viele Einschlusskörperchen befinden und daher Zählfehler auftreten. Im Hinblick auf diese beiden Überlegungen und je nach Anzahl der ausgebildeten Einschlusskörperchen wird eine entsprechende Vergrößerung gewählt, es wird aber darauf geachtet, dass innerhalb eines Versuches die verwendete Objektivvergrößerung dieselbe ist. Bei allen Versuchen wurde eine Kontrolle mitgeführt, um unspezifische Einflüsse zu erfassen und eine davon unabhängige Aussage zu erhalten. Für jede der einzelnen Konzentrationen an Wachstumsfaktoren wird der Versuch in vier Näpfen durchgeführt. Der Mittelwert wird ermittelt und in den Schaubildern dargestellt. Außerdem wurden die Versuche unter denselben Bedingungen wiederholt.

Für jeden der zwei unter denselben Bedingungen, aber zeitlich getrennt ablaufenden Versuche wurde ein Steigerungsfaktor berechnet. Diese können dann verglichen werden.

Generell ist die Wertigkeit eines in vitro Systems zur Untersuchung der Interaktion zwischen Wirtszelle und Chlamydie und deren Beeinflussung durch bestimmte Faktoren begrenzt. In vivo, das heißt bei der Infektion eines Organismus spielen sicherlich viele andere Einflüsse

eine Rolle und die Beziehung zwischen Wirt und Chlamydie ist durch die Summe der einzelnen Effekte geprägt.

5. 3. Beeinflussung der Internalisierung der Chlamydien durch EGF und Insulin

C. pneumoniae wird im Zuge ihres Vermehrungszyklus in HEp-2-Zellen internalisiert. Nach der Adhäsion der Elementarkörperchen an der Zellmembran muss nun eine Reaktion der Zelle erfolgen, die eine Aufnahme der Chlamydien in die Zelle ermöglicht.

Auch von anderen, nicht obligat intrazellulären Bakterien ist bekannt, dass sie in der Lage sind, in Wirtszellen einzudringen, indem sie Rezeptoren dieser Zellen aktivieren.

An der Internalisierung von *Salmonella typhimurium* und *E. coli* scheinen Tyrosinkinaserzeptoren wie der EGF-Rezeptor beteiligt zu sein (Galan et al., 1994, Straube et al., 2000). Ob dieser Rezeptor auch für die Aufnahme von *C. pneumoniae* eine Bedeutung hat, ist bislang unklar. Wir konnten eine Steigerung der Internalisierung von *C. pneumoniae* durch Vorinkubation der Zellen mit EGF zeigen. Dabei war dieser Effekt weitgehend dosisabhängig mit einem Maximum bei 5-10 µg EGF/ml Medium. Höhere Konzentrationen führten zu einer weniger guten Aufnahme der Chlamydien in die Zielzelle.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit dem EGF-haltigen Medium findet eine Interaktion des EGF mit seinem Rezeptor auf der Zelle statt. Die Aktivierung der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors führt zur Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Proteine und so zur Aktivierung verschiedener Wege der intrazellulären Signalkaskade. Die Phosphorylierung des Enzyms Phospholipase C gamma 1 und die Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat resultiert in einem Anstieg der Spaltprodukte Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-triphosphat (Meisenhelder et al., 1989, Nishibe et al., 1990, Wahl et al., 1988). Die Phospholipase A2 wird durch den IP-3-vermittelten Anstieg freier Kalziumionen in der Zelle aktiviert (Spaargaren et al., 1992) und kann die Arachnidonsäurefreisetzung und über Cyclooxygenasen und Lipoxxygenasen die Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen vermitteln. Leukotriene beeinflussen den Auf- und Umbau des Aktin-Zytoskelettes, indem sie in Abhängigkeit von ihrer Konzentration eine Polymerisation bzw. Depolymerisation von Aktin oder die Auflösung sogenannter „stress-fibers“ bewirken (Brom et al., 1992; Peppelenbosch et al., 1995).

Die Tyrosinkinaseaktivierung hat außerdem Einfluss auf Aktin bindende Proteine wie Profilin und Gelsolin. Über PIP-2 können Komplexe des Profilin mit Aktin (Profilaktin), gespalten und Aktin freigesetzt werden. Dieses Aktin steht dann nahe der inneren Membran zur Polymerisation zur Verfügung. PIP-2 liegt in der ruhenden Zelle zu schätzungsweise 95% an Profilin gebunden vor. So wird es vor der hydrolytischen Wirkung der PLC gamma geschützt.

Kommt es zur Aktivierung eines Tyrosinkinaserzeptors und tritt doch eine Hydrolyse auf, so wird der Komplex aus acht PIP-2- und einem Profilinmolekül instabil und führt zu einer schnell ansteigenden Verfügbarkeit von Substraten. Dies kann eine Erklärung für die schnelle und umfassende Änderung im Zytoskelett der Zelle nach Rezeptoraktivierung sein (Forscher, 1992).

Gelsolin, ein anderes Aktinbindendes Protein, wird durch den steigenden intrazellulären Kalziumspiegel in Gegenwart von PIP-2 aktiviert und zerlegt Aktinpolymere in kleinere Bruchstücke. So wird eine Neuorganisation der Aktinfilamente ermöglicht (Forscher, P., 1989).

Die Veränderungen des Aktinzytoskelettes durch die genannten Mechanismen stehen möglicherweise mit der Aufnahme von *C. pneumoniae* in die Zielzelle in Zusammenhang. Dabei ist aber im einzelnen nicht bekannt, welche Schritte bis zur Internalisierung noch ablaufen.

In A-431- und HEP-2-Zellen konnte nach Zugabe von EGF ein „Ruffling“, eine Auffaltung der Zellmembran, und eine Zunahme der rezeptorabhängigen Pinozytoseaktivität beobachtet werden (Chinkers et al., 1979; Willingham et al., 1983; Jones et al., 1993). Diese Vorgänge werden nach Rezeptoraktivierung über den Signalweg der kleinen GTPasen Rac und Rho vermittelt (Ridley et al., 1992).

Ein solches „Ruffling“ konnte, wie nach EGF-Rezeptor Aktivierung, auch bei der Internalisierung von *Salmonella typhimurium* beobachtet werden. In beiden Fällen erfolgte auch eine passive Aufnahme von nichtinvasiven Salmonellen und *E. coli* (Francis et al., 1993). Da eine Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Salmonellen bei ihrer Invasion in die Zelle beschrieben wird, vermutet man auch hier eine Rolle des EGF-Rezeptors bei der Ausbildung von „membrane ruffles“. Diese Membranveränderungen sind durch Hemmstoffe der Aktinpolymerisation wie Cytochalasin B und D hemmbar (Jones et al., 1993). Möglicherweise wird über Veränderungen der Zellmembran und des (Aktin)-Zytoskelettes, die der EGF-Rezeptoraktivierung folgen, auch eine Internalisierung der Chlamydien erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht. Vorgänge wie Zytoskelettveränderungen und Membranveränderungen, die in der Zelle durch EGF ausgelöst werden, entsprechen eventuell auch den Zellveränderungen, die für die Aufnahme von Chlamydien erforderlich sind.

Eine konzentrationsabhängige Wirkung des EGF auf die Internalisierung passt zu diesem Modell. Auch der submaximale Effekt unter 20 µg EGF/ml Medium kann durch eine negative Rückkopplung im Bereich der Signalkaskade erklärt werden. Eine solche Wirkung wird für die Proteinkinase C beschrieben (Takayama et al., 1988). Außerdem ist z. B. auch die

Wirkung der gebildeten Leukotriene auf das Zytoskelett von deren Konzentration abhängig (Brom et al., 1992). Am ehesten ist diese Beobachtung aber auf eine Internalisierung schon „besetzter“ EGF-Rezeptoren zurückzuführen.

Chlamydien können aber auch ohne die Wirkung von EGF internalisiert werden. Möglicherweise kann eine Aktivierung des EGF Rezeptors auch auf anderen Wegen geschehen. Man muss aber davon ausgehen, dass zusätzlich andere Möglichkeit einer Internalisierung der Chlamydien existieren. Für die Existenz und eventuell auch das Überwiegen anderer Aufnahmewege spricht, dass im Vergleich mit anderen Untersuchungen eine Steigerung der Internalisierung unter EGF auf etwa das Doppelte nur relativ gering ist. Die Behandlung epithelialer Zellen mit EGF vor der Zugabe von *E. coli* O18 steigerte deren Internalisierung um Zehnerpotenzen. Diese EGF-abhängige Internalisierung konnte durch Tyrosinkinaseinhibitoren unterdrückt werden (Straube et al., 2000).

Die Möglichkeiten der rezeptorvermittelten Endozytose und der Phagozytose von Chlamydien sind aus der Literatur bekannt, allerdings gibt es nur wenig Erkenntnisse zu *C. pneumoniae*. Ultrastrukturelle Analysen der Internalisierung von *C. trachomatis* Serovar E und *C. psittaci* CAL-10 zeigen, dass die Elementarkörperchen vorzugsweise an Mikrovilli der Zielzelle binden und dann mit clathrinausgekleideten Einstülpungen der Zellmembran assoziiert sind. Dies ist charakteristisch für eine rezeptorabhängige Endozytose bzw. Pinozytose (Hodinka et al., 1988). Durch die Anlagerung von *C. trachomatis* L2 an HeLa-Zellen wird eine Tyrosinphosphorylierung von Proteinen, die mit F-Aktin verbunden sind, induziert. Die Chlamydien werden dann in einem Vesikel in die perinukleäre Region transportiert und dabei von den phosphorylierten Proteinen und Aktin begleitet (Birkelund et al., 1994). Wird die Formierung von Aktinstrukturen durch Cytochalasin D gehemmt, so entstehen keine Vesikel (Fawaz et al., 1997). In Untersuchungen zur Aufnahme von *C. pneumoniae* in eine Wirtszelle zeigt sich allerdings nur eine gering ausgeprägte Phosphorylierung von Proteinen im Vergleich zur Internalisierung von *C. trachomatis* (Claussen et al., 1997).

Der andere beschriebene Aufnahmeweg von Chlamydien ist der über die Phagozytose:

C. trachomatis wird dabei über einen mikrofilament- und mikrotubuliabhängigen Mechanismus aufgenommen. Das Elementarkörperchen bindet rundherum an die Wirtszelle und bildet dann eine endozytotische Vakuole. Neben der lokalisierten Ansammlung von Aktin an der Bindungsstelle von *C. trachomatis* führt die Bindung zur Ausbildung von längeren Mikrovilli. Eine Hemmung dieser Vorgänge mit Cytochalasin D war auch mit einer Reduktion der Internalisierung von Chlamydien verbunden (Carabeo et al., 2002). Auch in

anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung von adhärenenten Chlamydien nach Erwärmung auf 37°C in nicht clathrinausgekleidete Vesikel erfolgt. Sie ist durch Monodansylcadaverin und Amantadin nicht hemmbar, wohl aber durch Hemmstoffe der Mikrotubuli- und Mikrofilament-Funktion. Dieser Aufnahmemodus entspricht nicht der klassischen rezeptorvermittelten Aufnahme (Ward and Murray, 1984).

Es liegen Hinweise für die Phagozytose als überwiegenden Aufnahmemodus (Boletti et al, 1999, Reynolds et al., 1990 und 1991) und dagegen (Reynolds und Pearce, 1991 und 1990, Schramm und Wyrick, 1995) vor, wobei einige der widersprüchlichen Ergebnisse durch die Art der Chlamydien, den Zelltyp oder die Versuchsbedingungen erklärt werden können. Es ist wahrscheinlich, dass Chlamydien verschiedene Wege benutzen können. Dabei scheint die Aufnahme über Phagozytose hinsichtlich der Infektiosität der Organismen die produktivere zu sein (Reynolds und Pearce, 1991).

Actidion als proteinsynthesehemmendes Agens hat nur eine geringe Reduktion der stimulierten Internalisierung von *C. pneumoniae* zur Folge. Das lässt vermuten, dass die meisten der für die Aufnahme der Chlamydien benötigten Proteine schon in der Zelle vorliegen. Auch der Zeitrahmen, in dem die Internalisierung erfolgt, spricht nicht dafür, dass eine de novo Proteinsynthese notwendig ist. Beides ist gut mit dem Modell der EGF-vermittelten Internalisierung vereinbar, da die Proteine der Signalkaskade und des Zytoskelettes in der Zelle vorhanden sind und eine Neusynthese von Proteinen erst eine späte Folge der Rezeptoraktivierung zu sein scheint.

Eine zentrale Rolle bei der Aufnahme von Bakterien scheint die Phospholipase und die über diesen Weg resultierenden Zytoskelettveränderungen zu haben. So konnte auch für die Aufnahme von uropathogenen *E. coli* eine Hemmung der EGF-stimulierten Internalisierung durch Hemmung der Phospholipase, Cyclooxygenase und Lipooxygenase gezeigt werden. Diese Hemmstoffe führten zu keiner Veränderung der Internalisierung in Zellen, wenn diese nicht durch EGF stimuliert wurden (Straube et al., 2000).

Außerdem zeigte sich eine komplette Unterdrückung der unstimulierten Internalisierung von *E. coli*, wenn die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) gehemmt wurde. Dies spricht für eine Rolle der PI-3 K bei der Internalisierung von *E. coli*, möglicherweise auch anderer invasiver Bakterien in Abwesenheit von EGF. Ob dies auch für die insulinrezeptorabhängige PI-3-K bei der Internalisierung von *C. pneumoniae* zutrifft, bleibt offen. Eine Stimulierung mit Insulin kann die Internalisierung von *C. pneumoniae* in unseren Versuchen nicht steigern, denkbar ist aber eine Funktion bei der unstimulierten Aufnahme.

Insulin steigert die Internalisierung von Chlamydien und Bildung der Einschlusskörperchen in unseren Untersuchungen nicht signifikant. Insulin zeigt vorwiegend metabolische Wirkungen, obwohl dies im Zusammenhang mit den nachgewiesenen Signaltransduktionswegen noch nicht vollständig erklärbar ist. Insulin hat aber auch proliferationssteigernde Wirkungen (Straus et al., 1984) und zeigt in der Zellkultur Effekte, die denen des EGF ähneln, wie die Auffältelung der Membran und eine Steigerung der Pinozytose (Kadowaki et al., 1987). Auch eine Phosphorylierung von Aktin ist beschrieben.

Der Insulinrezeptor ist als weiterer Tyrosinkinase-Rezeptor bekannt. Unterschiede zum EGF-Rezeptor bestehen im Vorliegen des Rezeptors als kovalent gebundenes Dimer, im Gegensatz zum EGF-Rezeptor, der erst nach seiner Aktivierung nicht kovalent gebundene Dimere bzw. Oligomere bildet. Die Signalkaskade nach Rezeptoraktivierung gleicht in weiten Teilen der des EGF-Rezeptors. Ein offensichtlicher Unterschied ist dabei aber, dass der Insulinrezeptor über das Insulinrezeptorsubstrat mit den weiteren Effektoren der Signalkaskade in Verbindung steht. Der EGF Rezeptor hingegen bildet wie die meisten Rezeptortyrosinkinasen direkt mit seinen Substraten relativ stabile Komplexe über deren SH2-domänen.

Die Phospholipase C gamma ist kein Substrat des Insulinrezeptors (Nishibe et al., 1990). Somit ist davon auszugehen, dass eine Synthese von IP-3 und DAG infolge der Spaltung von Arachnidonsäuren aus der Membran nicht stattfindet. Dies ist in der Signalkaskade des EGF-Rezeptors jedoch ein wesentlicher Schritt. Die beschriebenen Membranveränderungen durch Insulin werden wahrscheinlich über die PI-3-K vermittelt. Alleine sind sie jedoch wohl nicht in der Lage, entscheidende Voraussetzungen für die Internalisierung von *C. pneumoniae* zu schaffen. Es konnte jedoch bei uropathogenen *E.coli* und *Pseudomonas aeruginosa* eine vermehrte Internalisierung in HEp-2-Zellen durch Insulin nachgewiesen werden (Straube et al. 2000). Möglicherweise ist dies über die Zytoskelettveränderungen zu erklären, die über die PI-3-K vermittelt werden.

6. Zusammenfassung

Chlamydien sind aufgrund ihres Vermehrungszyklus obligat intrazelluläre Bakterien. Der genaue Aufnahmemechanismus von *Chlamydia (C.) pneumoniae* in ihre Wirtszelle ist bislang nicht bekannt. Um die Beteiligung verschiedener Rezeptoren und ihrer Signaltransduktionswege bei der Internalisierung der Elementarkörperchen in HEp-2-Zellen zu untersuchen, wurden Versuche mit den Wachstumsfaktoren EGF und Insulin durchgeführt. Zunächst war ein reproduzierbares Meßsystem zur quantitativen Erfassung der internalisierten Chlamydien in Form ihrer Einschlusskörperchen notwendig. Dazu wurden verschiedene Faktoren, die die Internalisierung der Chlamydien beeinflussen, weiter untersucht und mit diesen Ergebnissen eine Versuchsanordnung erarbeitet. Um eine Internalisierung von ca. 10 % aller vorliegenden Chlamydien in HEp-2-Zellen zu erreichen, wurden die Zentrifugationsparameter Dauer und Beschleunigung auf 15 Minuten und 1000g reduziert. So ist eine Steigerung der Internalisierung auf das zehnfache mit diesem Versuchsmodell nachweisbar. Eine mögliche Steigerung wurde durch den Einfluss von PEG belegt. Unter 10% PEG im Medium während der Zentrifugation bildeten sich bis zu 30 % mehr Einschlusskörperchen aus.

Aktidion hatte einen geringen hemmenden Effekt auf die Internalisierung. Maximal reduzierte sich die Bildung von Einschlusskörperchen um 25%. Von einem proteinsyntheseabhängigen Prozess bei der Internalisierung kann, zumal innerhalb von 20 Minuten, nicht ausgegangen werden.

Um Einflüsse von Wachstumsfaktoren aus dem Zellkulturmedium zu minimieren, wurde eine Zellkultur mit serumfreier Inkubation in den letzten 24 h durchgeführt. Darunter ließ sich eine Steigerung der Internalisierung um bis auf das Doppelte nachweisen. Auch das Zellkulturgefäß (Röhrchen oder Mikrotiterplatte) hat einen Einfluss auf die Internalisierungsrate. So ist diese in Zellkulturröhrchen mit Glasplättchen, auf denen die Zellen wachsen, etwas höher als in Näpfen der Mikrotiterplatte, die einen Kunststoffboden besitzen.

Die Versuche zur Ermittlung der EGF-Wirkung wurden in 96-Napf-Mikrotiterplatten mit HEp-2-Zellen mit und ohne Zentrifugation (1000g über 15 Minuten) durchgeführt. Es wurden sechs verschiedene Konzentrationen EGF (20 – 0,06 µg EGF/ ml Medium) in der einstündigen Vorinkubation und bei der Zentrifugation gegen die Kontrolle ohne EGF getestet. Außerdem wurden die selben Versuchsansätze in Zellkulturröhrchen mit Zentrifugation ausgeführt. Unter der Wirkung verschiedener Konzentrationen EGF im

Medium erhöhte sich die Zahl der internalisierten Chlamydien weitgehend konzentrationsabhängig. Dieser Effekt ließ sich mit und ohne Zentrifugation nach der Beimpfung des Zellrasens und sowohl in Mikrotiterplatten als auch in Zellkulturröhrchen nachweisen. Die Steigerung der Internalisierung lag in den Versuchen mit Zentrifugation mit dem maximal 2, 4-fachen (Mikrotiterplatte) bzw. 2,3-fachen (Zellkulturröhrchen) höher als in den Ansätzen ohne Zentrifugation (maximal 1,9-fache Steigerung).

Dabei wurden die maximalen Steigerungen unter der Wirkung von 10 oder 5 µg EGF /ml Medium beobachtet und waren auch in allen Versuchen signifikant ($p \leq 0,01$).

Unter dem Einfluss von 20 µg/ml liegt die Internalisierung der Chlamydien unter dem Maximum. Möglicherweise deutet dies auf eine negative Rückkopplung am beteiligten Rezeptor hin bzw. ist durch eine Internalisierung der "besetzten" EGF-Rezeptoren zu erklären.

Versuche mit derselben Anordnung wurden mit Insulin in verschiedenen Konzentrationen (1000 – 0,01 ng Insulin/ml Medium) durchgeführt. Eine signifikante Steigerung der Internalisierung zeigte sich dabei nicht.

Wir gehen davon aus, dass die Aktivierung der EGF-Rezeptors über verschiedene Signaltransduktionswege mit den zentralen Molekülen Phospholipase C gamma 1 (PLC gamma 1) und der Spaltung von Phosphatidylinositolbiphosphat in Diacylglycerin und Inositoltriphosphat, der Phospholipase A 2 und Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen sowie der Beeinflussung der aktinbindenden Proteine Gelsolin und Profilin letztendlich zu einer Neuordnung der Aktinfilamente und zu einer Umgestaltung der Zellmembran („Membrane ruffling“) führt und dies eine Internalisierung der Chlamydien begünstigt.

Es ist aber davon auszugehen, dass dies nicht den einzigen Weg einer möglichen Internalisierung der Chlamydien darstellt. Als weitere Möglichkeiten werden z. B. die rezeptorunabhängige Phagozytose diskutiert.

Der aktivierte Insulinrezeptor ist zu einer wesentlichen Steigerung der Internalisierung nicht in der Lage, obwohl Vorgänge wie das „Membrane ruffling“ auch durch die Aktivierung des Insulinrezeptors beschrieben wurden. Möglicherweise beruht dies auf der etwas anderen Art der Signalkaskade, die im Wesentlichen über die Insulin-Rezeptor-Substrate und die Phosphatidylinositol-3-Kinase abläuft. Die PLC gamma 1 ist kein Substrat des Insulinrezeptors.

Literaturverzeichnis

1. **Allan, I., and J. H. Pearce.** 1977. Serum modulation of cell susceptibility to chlamydial infection. *FEMS Microbiol Lett* 1:211-214
2. **Allan, I and J. H. Pearce.** 1978. Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydial infection. *J Gen Microbiol* 111:87-92
3. **Barnes, D. und S. P. Colowick.** 1976. Stimulation of sugar uptake in cultured fibroblasts by epidermal growth factor (EGF) and EGF-binding arginine esterase. *J Cell Physiol* 89:633-639
4. **Belzen, N., v. M. Spaargaren, A. J. Verkleij und J. Boonstra.** 1990. Interaction of epidermal growth factor receptors with the cytoskeleton is related to receptor clustering. *J Cell Physiol* 145:365-375
5. **Berlau, J., A. Groh und E. Straube.** 1996. Improved isolation of *Chlamydia pneumoniae* from synovial cell cultures by using Polyethylene Glycol. *Med Microbiol Lett* 5:167-172
6. **Birkelund, S., H. Johnson und G. Christiansen.** 1994. *Chlamydia trachomatis* serovar L induces protein phosphorylation during uptake by HeLa cells. *Infect Immun* 62:4900-4908
7. **Boletti, H., A. Benmerath, D. M. Ojcius, N. Cerf-Benussan und A. Daunt-Varsat.** 1999. Chlamydia infection of epithelial cells expressing dynamin and Eps15 mutants: clathrin independent entry into cells and dynamin dependent productive growth. *J Cell Sci* 112:1487-1496
8. **Boonstra, J.** 1999. Growth factor- induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *FASEB J* 13:35-41
9. **Brom, C., J. Brom und W. König.** 1992. Neomycin induces stimulatory and inhibitory effects on leukotriene generation, guanine triphosphatase activity, and actin polymerisation within human neutrophils. *Immunology*, 75:150-156
10. **Brunk, U. J. Schellens and B. Westermarck.** 1976. Influence of epidermal growth factor (EGF) on ruffling activity, pinocytosis and proliferation of cultivated human glia cells. *Exp Cell Res* 103:295-302
11. **Campbell, L. A., C.-C. Kuo und J. T. Grayston.** 1990. Structural and antigenic analysis of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 58:93-97

12. **Carabeo, R. A., S. S. Grieshaber, E. Fischer und T. Hackstadt.** 2002. *Chlamydia trachomatis* induces remodelling of actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infect Immun* 70:3793-3803
13. **Carpenter, G.** 1987. Receptors for epidermal growth factor and other polipeptide mitogens. *Ann Rev Biochem* 56:881-914
14. **Carpenter, G. und S. Cohen.** 1979. Epidermal Growth Factor. *Ann Rev Biochem* 48:193-216
15. **Carpenter, G., L. King und S. Cohen.** 1978. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nat* 276:409-410
16. **Carpenter, G. und S. Cohen.** 1976a. 125I-labeled human EGF (hEGF): binding, internalisation, and degradation in human fibroblasts. *J Cell Biol* 71:159-171
17. **Catalogue of cell lines and hybridomas, ATCC.** 1988. 6th Edition. 16-17
18. **Chi, E. Y., C.-C. Kuo und J. T. Grayston.** 1987. Unique ultrastructure in elementary body of *Chlamydia sp.* strain *TWAR*. *J Bacteriol* 169:3757-3763
103. **Chinkers, M., McKanna, J. A. und S. Cohen.** 1976. Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 83: 260-265
19. **Clausen, J. D., G. Christansen, H. U. Holst und S. Birkelund.** 1997. *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. *Mol Microbiol* 25:441-449
20. **Cohen, S., G. Carpenter und L. King Jr.** 1979. Epidermal Growth Factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255, 4834-4842
21. **Covelli, I. R., Mozzi, R. Rossi und L. Frati.** 1972. Mechanism of action of the epidermal growth factor. Stimulation of the uptake of labelled precursors into RNA, DNA, and proteins induced by EGF in isolated tumor cells. *Hormones* 3:183-191
22. **Cummings, R. D., A. M. Soderquist und G. Carpenter.** 1985. The oligosaccharide moieties of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. Presence of complex-type N-linked chains that contain terminal N-acetylgalactosamine residues. *J Biol Chem* 260:1944-1952
23. **Den Hartigh, J. C., P. M. P. van Bergen en Henegouwen, A. J. Verkleij und J. Boonstra.** 1992. The EGF-receptor is an actin binding protein. *J Cell Biol* 119:349-355

24. **Diakonova, M., Payrastre, B., A. G. van Belzen, W. J. Hage, P. M. P. van Bergen en Henegouwen, J. Boonstra, F. F. M. Cremers und B. M. Humbel.** 1995. Epidermal Growth factor induces rapid and transient association of phospholipase C gamma 1 with EGF-receptor and filamentous actin at membrane ruffles of A 431 cells. *J Cell Sci* 108:2499-2509
25. **Downward, J., P. Parker und M. D. Waterfield.** 1984. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nat* 311:483-485
26. **Fawaz, F. S., C. van Ooij, E. Homola, S. C. Mutka und J. N. Engel.** 1997. Infection with *Chlamydia trachomatis* alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. *Infect Immun* 65:5301-5308
27. **Forscher, P.** 1989. Calcium and phosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *TINS* 12: 468-474
28. **Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith and S. Falkow.** 1993. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nat* 364:639-642
29. **Galan, J. E.** 1992. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*. *Nat* 357:588-589
30. **Gibson, J. P., R. M. Egerer und D. L. Wiedbrauk.** 1993. Improved isolation of *Chlamydia trachomatis* from a low-prevalence population by using polyethylene glycol. *J Clin Microbiol* 31:292-295
31. **Grayston, J. T.** 1992. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain *TWAR*. *Clin Infect Dis* 15:757-63
32. **Grayston, J. T., C.-C. Kuo, L. A. Campbell und S.-P. Wang.** 1989. *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain *TWAR*. *Int J Syst Bacteriol* 39:88-90
33. **Grayston, J. T., C.-C. Kuo, S.-P. Wang und J. Altman.** 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, *TWAR*, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* 315:161-168
34. **Gregory, H., J. E. Holmes und I. R. Willshire.** 1977. Urogastrone levels in the urine of normal adult humans. *J Clin Endocrinol Metab* 45:668-672
35. **Guma, A., F. Vinals, X. Testar, M. Palacin und A. Zorzano.** 1993. Regulation of system amino-acid transport activity by phospholipase C and camp including agents in skeletal muscle: modulation of insulin action. *Biochem Biophys Acta* 1176:155-161

36. **Hahn, D.L., R. W. Peeling, E. Dillon, R. McDonald und P. Saikku.** 2000. Serologic markers for *Chlamydia pneumoniae* in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 84:227-233
37. **Haigler, H., J. F. Ash, S. J. Singer und S. Cohen.** 1978. Visualization by fluorescence of the binding and internalisation of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:3317-3321
38. **Hayashi, T und S. Sakamoto.** 1988. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (hEGF) levels in human body fluids. *J Pharmacobiodyn* 11:146-151
39. **Hodinka, R. L., C. H. Davis, J. Choong und P. B. Wyrick.** 1988. Ultrastructural study of endocytosis of *Chlamydia trachomatis* by McCoy cells. *Infect Immun* 56:1456-1463
40. **Hollenberg, M. D. und P. Cuatrecasas.** 1975. Insulin and epidermal growth factor. Human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and amino acid uptake. *J Biol Chem* 250:3845-3853
41. **Honegger, A. M., R. M. Kris, A. Ullrich und J. Schlessinger.** 1989. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:925-929
42. **Ino, M., K. Ushiro, C. Ino, T. Yamashita und T. Kumazawa.** 1993. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl* 500:126-130
43. **Jones, B. D., H. F. Paterson, A. Hall und S. Falkow.** 1993. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth-factor-receptor-independent mechanism. *Cell Biol* 90:10390-10394
44. **Kadowaki T., S. Koyashu, E. Nishida, K. Tobe, T. Izumi, F. Takaku, H. Sakai, I. Yahara und M. Kasuga.** 1987. Tyrosine phosphorylation of common and specific sets of cellular proteins rapidly induced by insulin, insulin-like growth factor I and epidermal growth factor in an intact cell. *J Biol Chem* 1987 262:7342-7350
45. **Kenny, G. E.** 1993. Origin of HEp-2-cells used for culture of Chlamydiae. *J Clin Microbiol* 31:470-472
46. **Knudsen, K., A. S. Madsen, P. Mygind, G. Christiansen und S. Birkelund.** 1999. Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun* 67:375-383
47. **Koch, C. A., D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis and T. Pawson.** 1991. SH2 und SH3 Domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Sci* 252:668-674

48. **Krivan, H. C., B. Nilsson, C. A. Lingwood und H. Ryu.** 1991. *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* bind specifically to Phosphatidylethanolamine in HeLa cells and to GALNACbeta1-4GALbeta1-4GLC sequences found in asialo-GM1 and asialoGM2. *Biochem and Biophys Res Com* 175:1082-1089
49. **Kuo, C.-C. and J. T. Grayston.** 1988. Factors affecting viability and growth in HeLa 229 cells of *Chlamydia* sp. strain *TWAR*. *J Clin Microbiol* 26:812-815
50. **Kuo, C. C., E. Y. Chi und J. T. Grayston.** 1988. Ultrastructural study of entry of *Chlamydia* strain *TWAR* into HeLa cells. *Infect Immun* 56:1668-1672
51. **Kuo, C.-C., H.-H. Chen, S.-P. Wang and J. T. Grayston.** 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strain called *TWAR*. *J Clin Microbiol* 24:1034-1037
52. **Kuo C. C. und T. Grayston.** 1976. Interaction of *Chlamydia trachomatis* organisms and HeLa 229 cells. *Infect Immun* 13:1103-1109
53. **Lange-Carter, C. A., C. M. Pleiman, A. M. Gardner, K. J. Blumer und G. L. Johnson.** 1993. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science Wash DC* 260:315-319
54. **Lee, J. und P. F. Pilch.** 1994. The insulin receptor: structure, function and signaling. *Am Physiol Soc C*:319-334
55. **Löffler und Petrides.** 1990. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage. 794-796
56. **Maass, M., A. Essig, R. Marre und W. Henkel.** 1993. Growth in serum free medium improves isolation of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 31:3050-3052
57. **Margolis, B., N. Li, A. Koch, M. Mohammadi, D. R. Hurwitz, A. Zilberstein A. Ullrich, T. Pawson und J. Schlessinger.** 1990. The tyrosine phosphorylated carboxyterminus of the EGF receptor is a binding site for GAP and PLC-gamma. *EMBO J* 9:4375-4380
58. **Meisenhelder, J., P. G. Suh, S. G. Rhee und T. Hunter.** 1989. Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 57:1109-1122
59. **Meiyeer, A., C. E. Vallinga und J. M. Ossewaarde.** 1996. A microcarrier culture method for the production of large quantities of viable *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:132-7.
60. **Miyashita, N., A. Matsumoto, R. Soejima, Y. Kubota, T. Kishimoto, M. Nakajima, Y. Niki und T. Matsushima.** 1996. Evaluation of a direct fluorescent

antibody assay for detection of *Chlamydia pneumoniae*. Kansenshogaku Zasshi 70:224-231

61. **Moolenaar, W. H., L. G. J. Tertoolen und S. W. de Laat.** 1984. Growth factors immediately raise cytoplasmatic free Ca^{2+} in human fibroblasts. Biol Chem 259: 8060-8069
62. **Nishibe, S., M. I. Wahl, S. M. Hernandez-Sotomayor, N. K. Tonks, S. G. Rhee und G. Carpenter.** 1990. Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation. Sci 250:1253-1256
63. **Nishibe, S., M. I. Wahl, P. B. Wedegaertner, J. W. Kim, S. G. Rhee und G. Carpenter.** 1990. Selectivity of phosphorylase C phosphorylation by the epidermal growth factor receptor, the insulin receptor, and their cytoplasmatic domains. Proc Natl Acad Sci USA 87:424-428
64. **Nishida, E. und Y. Gotoh.** 1993. The MAP Kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. Trends Biochem. Sci. 18:128-131
65. **Peppelenbosch, M., R.-G. Qiu, A. M. M de Vries-Smits, L. G. J. Tertoolen, S. W. de Laat, F. McCormick, A. Hall, M. H. Symons und L. Bos.** 1995. Rac mediates Growth Factor Induced Arachidonic Acid Release. Cell. 81:849-856
66. **Peppelenbosch, M. P., L. G. Tertoolen, W. J. Hage und S. W. de Laat.** 1993. Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. Cell 74:565-575
67. **Perez Melgosa, M., C.-C. Kuo und L. A. Campbell.** 1993. Outer membrane complex proteins of *Chlamydia pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett 112:199-204
68. **Prain, C. J. und J. H. Pearce.** 1989. Ultra structural studies on the intracellular fate of *Chlamydia psittaci* (strain *guinea pig inclusion conjunctivitis*) and *Chlamydia trachomatis* (strain *lymphogranuloma venerum*): modulation of intracellular events and relationship with endocytose mechanism. J Gen Microbiol 135:2107-2123
69. **Reynolds, D. J. und J. H. Pearce.** 2001. Endocytotic mechanisms utilized by Chlamydiae and their influence on introduction of productive infection. Infect Immun 59:3033-3039
70. **Reynolds, D. J. and J. H. Pearce.** 1990. Characterization of the Cytochalasin D resistant (pinocytotic) mechanisms of endocytosis utilized by Chlamydiae. Infect Immun 58:3208-3216
71. **Ridley, A. J., W. E. Allen, M. Peppelenbosch und G. E. Jones.** 1999. Rho family proteins and cell migration. Biochem Soc. Symp. 65:111-123

72. **Ridley, A. J. , H. F. Paterson, C. L. Johnston D. Diekmann und A. Hall.** 1992. The small GTP binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70:401-410
73. **Ridley, A. J. and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70:389-399
74. **Roblin, P. M., W. Dumornay und M. R. Hammerschlag.** 1992. Use of HEp-2 cells for improved isolation and passage of *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Microbiol 30:1968-1971
75. **Rozengurt, E. und L. A. Heppel.** 1975. Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive 86RB⁺ influx in quiescent 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA 72:4492-4495
76. **Saikku P, M. Leinonen, K. Mattila, M. R. Ekman, M. S. Nieminen, P. H. Makela, J. K. Huttunen und V. Valtonen.** 1988. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, *TWAR*, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 2:983-986
77. **Savage, C. R., T. Inagami und S. Cohen.** 1972. The primary structure of epidermal growth factor. J Biol Chem 247:7612-7621
78. **Sawyer, S. T. und S. Cohen.** 1981. Enhancement of calcium uptake and phosphatidylinositol turnover by epidermal growth factor in A-431 cells. Biochem 20:6280-6286
79. **Schneider, J. A., I. Diamond und E. Rozengurt.** 1978. Glycolysis in quiescent cultures of 3T3 cells. Addition of serum, epidermal growth factor and insulin increases the activity of phosphofructokinase in a protein synthesis-dependent manner. J Biol Chem 253:872-877
80. **Schneider, W.** 1986. Untersuchungen zur Beeinflussung der Tenazität von Chlamydien in „Konservierungsmedien“ bei Temperaturen über und unter 0°C. Inaug-Diss der Justus Liebig Universität Gießen
81. **Schramm, N. und P. B. Wyrick.** 1995. Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. Infect Immun 63:324-332
82. **Sesti, G., M. A. Marini, P. Briata, A. N. Tullio, A. Montemurro, P. Borboni, R. Pierro, R. Gherzi und R. Lauro.** 1992. Androgens increase insulin receptor mRNA levels, insulin binding, and insulin responsiveness in Hep-2-larynx carcinoma cells. Mol Cell Endocrinol 82:111-118.

83. Shariff, A. und E. J. Luna. 1992. Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membranes. *Sci* 256:245-247
84. Spaargaren, M., S. Wissink., L. H. K. Defize, S. W. de Laat und J. Boonsta. 1992. Characterization and identification of an epidermal growth factor activated phospholipase A2. *Biochem J.* 287:37-43
85. Starkey, R. H. und D. N. Orth. 1977. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). *J Clin Endocrinol Metab* 45:1144-1153
86. Straube, E., B. Knöfel, T. Schneider, S. Schubert und R. Wetzker. 2000. Internalization of extraintestinal *Escherichia coli* O18 strains by epithelial cells is modulated by EGF, insulin and effectors of transmembrane signal transduction. *Int J Med Microbiol* 290:65-73
87. Straus, D. S. 1984. Growth-stimulatory actions of insulin in vitro and in vivo. *Endocrinol Rev* 5:356-369
88. Su, H., N. G. Watkins, Y. X. Zhang und H. D. Caldwell. 1990. *Chlamydia trachomatis* host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun* 58:1017-1025
89. Swanson, A. und Kuo, C. C. 1989. Identification of lectin-binding proteins in *Chlamydia* species. *Infect Immun* 58:502-507
90. Taha, C, und A. Klip. 1999. The insulin signalling pathway. *Membrane Biol* 169:1-12
91. Takayama, S., M. F. White and C. R. Kahn. 1988. Phorbol-ester induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 263:3440-3447
92. Thom, D. H., J. T. Grayston, S.-P. Wang, C.-C. Kuo und J. Altman. 1990. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae* and viral infections in acute respiratory diseases in a university student health clinic population. *Am J Epidemiol* 132:248-56
93. Tjhie, J. H. T., R. Roosendaal, D. M. MacLaren und C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls. 1997. Improvement of growth of *Chlamydia pneumoniae* on HEp-cells by pretreatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. *J Clin Microbiol* 35:1883-1884
94. Tsakiridis, T., P. Tong, B. Matthews, E. Tsiani, P. J. Bilan, A. Klipp und G. P. Downey. 1999. Role of actin cytoskeleton in insulin action. *Microsc Res Tech* 47:79-92

95. Ullrich, A., L Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, J. Downward, E. L. V. Mayes, N. Whittle, M. D. Waterfield und P. H. Seeburg. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nat* 309, 418-425
96. Ullrich, A., J. R. Bell, E. Y. Chen, R. Herrera, L. M. Petruzelli, T. J. Dull, A. Gray, L. Coussens, Y. C. Liao, M. Tsubokawa, A. Mason, P. H. Seeburg, C. Grunfeld, O. M. Rosen und J. Ramachandran. 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature Lond* 313:756-761
97. Ushiro, H. und S. Cohen, 1980. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* 255:8363-8365
98. Wahl, M. und G. Carpenter. 1988. Regulation of epidermal growth factor-stimulated formation of inositol phosphates in A-431 cells by calcium and protein kinase C. *J Biol Chem* 263:7581-7590
99. Wahl, M. I., J. D. Sweatt, G. Carpenter. 1987. Epidermal growth Factor (EGF) stimulates inositol trisphosphate formation in cells which overexpress the EGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 142:688-695
100. Ward, M. E. and A. Murray. 1984. Control mechanisms governing the infectivity of *Chlamydia trachomatis* for HeLa cells: mechanisms of endocytosis. *J Gen Microbiol* 130:1765-1780
101. Willingham, M. C., H. T. Haigler, D. J. P. Fitzgerald, M. G. Gallo, A. V. Rutherford und I. H. Pastan. 1983. The morphologic pathway of binding and internalization of epidermal growth factor in cultured cells. *Exp Cell Res* 146:163-175
102. Wong, K. H., S. K. Skelton und Y. K. Chan. 1992. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the respiratory tract. *J Clin Microbiol* 30:1625-1630
103. Woodland, R. M., R. P. Kirton, und S. Darougar. 1987. Sensitivity of Mitomycin treated McCoy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* from genital specimens. *Eur J Clin Microbiol* 6:654-656
104. Wuppermann, F. N., J. H. Hegemann. und C. A. Jantos. 2001. Heparan sulfate-like Glykosaminoglykan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 48:181-187

- 105. Wyrick, P. B. J. Choong, C. H. Davis, S. T. Knight, M. O. Royal A. S. Maslow und C. R. Bagnell.** 1989. Entry of genital *Chlamydia trachomatis* into polarized human epithelial cells. Infect Immun 57:2378-2389
- 106. Yoshizara, H., K. Dairiki und T. Yamazaki.** 1992. Comparison of sensitivity of HEp-2 cells with that of HL cells against *Chlamydia pneumoniae*. Kansenshogaku Zasshi 66:1037-1041
- 107. Zelllinienpass für BGM-Zellen.** Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin. BFA für Viruskrankheiten der Tiere.
- 108. Zelllinienpass für HEp-2-Zellen.** 1985. BFA für Viruskrankheiten der Tiere, 17498 Insel Riems
- 109. Zhang, J. P. und R. S. Stephens.** 1992. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. Cell 69:861-869

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Eberhard Straube, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, ganz herzlich bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat Matthias Hartmann für die Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche. Er stand mir stets mit erfahrener Rat hilfreich zur Seite.

Frau Rosemarie Seidel und Frau Bettina Hartung sowie Frau Dr. B. Knöfel möchte ich für die praktische Anleitung und Hilfe danken.

Lebenslauf

Christine Monika Burkhardt, geb. Raisch

Geb. am 06. 02. 1976 in Filderstadt-Plattenhardt

8/1982 – 7/1986 Grundschule in Nürtingen-Oberensingen

8/1986 – 6/1995 Max-Planck-Gymnasium Nürtingen

1995 Abitur

7/1995 – 9/1995 Pflegepraktikum im KKH Nürtingen

10/1995 – 12/2001 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

12/2001 Hochschulabschluss als Ärztin

1/02 - 6/2003 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin der FSU
Jena

Ort, Datum

Christine Burkhardt

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. E. Straube, Herr Dr. M. Hartmann, Frau R. Seidel, Frau B. Hartung und Frau Dr. B. Knöfel,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vor gelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Christine Burkhardt